Isolierung von Strukturproteinen des endogenen Pavianvirus BEV und Untersuchung einer spezifischen Immunantwort in humanen Seren

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dorothee Wernicke
aus Braunschweig

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0017

Isolierung von Strukturproteinen des endogenen Pavianvirus BEV und Untersuchung einer spezifischen Immunantwort in humanen Seren

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dorothee Wernicke
aus Braunschweig

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		21. Januar 1981
Dekan	:	Prof. Dr. A. Hager
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. R. Kurth
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Reinhard Kurth am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof.Dr. Kurth für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und für die vielen anregenden Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL	10
2.a.	Chemikalien	10
2.b.	Medien	11
2.c.	Seren	12
2.d.	Zellen	14
3.	METHODEN	15
3.a.	Virusernte und -reinigung	15
3.b.	Reinigung der Virusstrukturproteine	15
3.c.	Protein-Bestimmung	17
3.d.	Lectin-Kopplung	17
3.e.	IgG-Reinigung	18
3.f.	Immunoadsorbent-Säule	18
3.g.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	19
3.h.	PAS (Periodic acid Schiff)-Färbung	21
3.i.	Radioaktive Markierung mit $Na^{125}J$	21
3.k.	Herstellen von Zellysaten	22
3.l.	Radioimmunopräzipitationstest (RIA)	23
3.m.	Kompetitionstests	23
3.n.	Glycosidase-Verdau	24
4.	ERGEBNISSE	25
4.a.	Virusproteinreinigung	25
4.b.	Radioimmunotests	29
5.	DISKUSSION	44
6.	ZUSAMMENFASSUNG	49
7.	LITERATURVERZEICHNIS	51

Abkürzungen:

BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoäthan-sulfonsäure
BEV	Baboon-Endogenous-Virus
BoLV	Bovine-Leukemia-Virus
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	counts per minute
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
GALV	Gibbon-Ape-Leukemia-Virus
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PMSF	Phenylmethymsulfonylfluorid
RIA	Radioimmunotest
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SMRV	Squirrel-Monkey-Retrovirus
SSV/SSAV	Simian-Sarcoma-Virus mit seinem assoziiertem Virus Simian-Sarcoma-Associated-Virus
TCA	Trichloressigsäure
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung der RNA-haltigen Tumorviren (Oncoviren) 1908 durch Ellermann und Bang (1) sind mehr als siebzig Jahre vergangen, und inzwischen wurden die Oncoviren von einer großen und immer noch wachsenden Zahl von Spezies isoliert. Oncoviren verursachen ein weites Spektrum von Leukämien und Tumoren, von malignen, autoimmunen und zerebral-degenerativen Erkrankungen. Die am längsten bekannten und daher am besten untersuchten Tumorviren sind die des Huhns und der Maus, während die Primaten-Oncoviren erst im Laufe der letzten zehn Jahre isoliert wurden (2-5).

Die Oncoviren gehören zu der Klasse der Retroviridae. Sie haben einen Durchmesser von 100-120 nm, besitzen eine einsträngige 60-70S RNA, welche aus zwei gleichen Untereinheiten von 30-35S besteht, und sie enthalten eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte Reverse Transcriptase.

Nach morphologischen, immunologischen und biologischen Kriterien werden die Oncoviren eingeteilt in A-, B-, C- und D-Typ-Partikel (31). Außerdem wird noch eine Unterscheidung getroffen aufgrund des Übertragungsmodus: exogene Viren werden nur horizontal übertragen, endogene vertikal, d.h. ihr Genom ist in das der Zellen integriert und also auch in der Keimbahn vorhanden.

Viren der Typen A und B wurden in Primaten bis jetzt noch nicht gefunden, während von C- und D-Typ-Viren mehrere Isolate bekannt sind.

Eine Übersicht über die bisher in Primaten gefundenen C- und D-Typ-Viren bietet Tabelle 1.

Da sich diese Arbeit mit einem C-Typ-Virus beschäftigt, soll im folgenden kurz die Morphologie eines typischen C-Typ-Partikels dargestellt werden. Als Beispiel dient das

Tabelle 1: Primaten-Retroviren

	exogen (infektiös)			endogen (genetisch übertragbar)		
	Virus	isoliert aus	Gewebe/Organ	Virus	isoliert aus	Gewebe/Organ
C - Typ	SSV(SSAV)	Wollaffe (Lagothrix spp)	Fibrosarkom	BEV	Pavian (Papio cynocephalus)	Plazenta
	GALV	Gibbon (Hylobates lar)	Lymphosarkomzellen		inzwischen diverse Isolate	
		inzwischen diverse Isolate		MAC-1	Bären-Makaken (Macaca arctoides)	Milz
				OMC-1	Nachtaffe (Aotus trivirgatus)	Nierenzellinie
D - Typ	MPMV	Rhesusaffe (Macaca mulatta)	Mammacarcinom	SMRV	(Saimiri sciureaus)	Lungenzellkultur
				PO-1-Lu	Langur (Preslytis obscurus)	Lungenzellkultur

Friend-Leukämie-Virus (FLV) aus der Gruppe der murinen C-Typ-Viren.

Die Oberfläche der C-Typ-Partikel besteht aus einem Lipid-Bilayer, der "Viralen Membran", welche ein Teil der Wirtszellmembran war und bei der Knospung des Virus, dem sogenannten budding, mitgenommen wird. Auf dieser äußeren Membran sitzen die "Knobs", die von einem Glycoprotein mit dem Molekulargewicht 70000 gebildet werden (gp70). Die Knobs sind durch ein Protein mit dem Molekulargewicht 15000 (p 15E) mit der Virushülle verbunden, zu welcher auch noch ein Protein mit dem Molekulargewicht 12000 gehört (p 12E), dessen genaue Lage und Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Nach innen schließt sich an die Virushülle der sogenannte "Inner Coat" an, welcher von einem Protein mit dem Molekulargewicht 12000 (p 12) gebildet wird (29). Virushülle und Inner Coat umschließen den Viruskern, der aus einer äußeren Schale und dem inneren Ribonucleoprotein-Komplex besteht. Die Kernschale hat einen hexagonalen Aufbau und ihre Untereinheiten bestehen aus

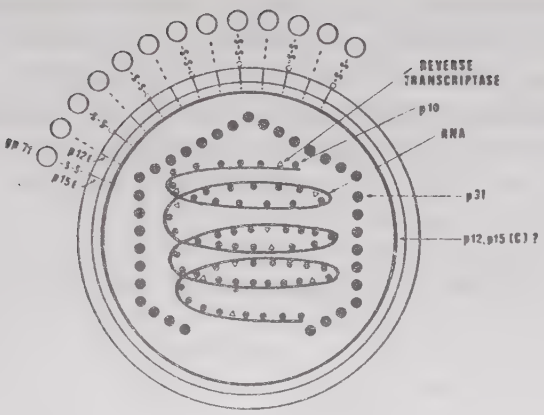


Abbildung 1: Modell eines C-Typ-Virus+

einem Protein mit dem Molekulargewicht 30000 (p 30). Zusätzlich findet man noch ein p 15 in der Kern-Schale, dessen genaue Lokalisation noch nicht bestimmt ist. Im Ribonucleoprotein-Komplex befinden sich die Virus-RNA, die Reverse Transcriptase und ein Protein p10.

In der Tabelle 2 werden die verschiedenen Strukturproteine und ihre Lokalisation im Virus zusammengefaßt.

Immunologische Untersuchungen haben ergeben, daß die Strukturproteine antigene Determinanten aufweisen, die in 3 Typen eingeteilt werden können:

1. Interspezies-spezifische Determinanten, welche eine Kreuzreaktion unter Viren verschiedener Spezies zeigen; sie sind z.B. auf dem gp70, dem p30 und dem p15 (bei einigen Viren p12) zu finden,

---

+Diese Abbildung wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. H. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, zur Verfügung gestellt.

2. Gruppen-spezifische Determinanten, welche nur bei murinen Retroviren eine Rolle spielen und nur mit Viren der gleichen Spezies kreuzreagieren, und
3. Typ-spezifische Determinanten, welche charakteristisch sind für einen bestimmten Virusstamm einer Spezies. Sie sind auf dem p12 (bei einigen Viren p15) zu finden.

Tabelle 2: Strukturkomponenten der Säuger-C-Typ-Viren (30,55)

Protein	Struktur-komponente	Virus-Struktur
gp70 (10 %)	Knob	
p 15E (2 %)	Spike	Virushülle
p 12E (13 %)		
p 12 (7 %)	Inner Coat	Inner Coat
p 30 (50 %)	Kern-Schale	Äußerer Kern
p 15C (13 %)	Kern-assoz.	
p 10 (4 %)	Nucleoprotein	Ribonucleoprotein-Komplex
p 70 (1 %)	Reverse Transcriptase	

Retroviren phylogenetisch nah verwandter Spezies sind sich biochemisch und immunologisch ähnlich, doch besitzen sie einen stark spezifischen Wirtsbereich. Es gibt dementsprechend bisher keine Hinweise, daß ein bereits bekanntes Säuger-Retrovirus direkt eine oncogene Wirkung im Menschen hat. Es ist jedoch durchaus möglich, daß ein humanes C-Typ-Virus interspezies-spezifische Eigenschaften mit Viren nah verwandter Säuger - z.B. den Viren der Affen - besitzt.

Der Prototyp eines endogenen Primaten-Virus ist das BEV (baboon endogenous virus), welches 1973 von Kalter et al. aus einer Pavian-Plazenta isoliert werden konnte (4). BEV

zeigt zum Teil Kreuzreaktionen mit anderen Säuger-C-Typ- und auch -D-Typ-Viren, ist aber immunologisch nicht verwandt mit den exogenen Primatenviren SSV(SSAV) und GALV (siehe Tab. 1). BEV ist ein typisches endogenes Virus, dessen provirale DNA-Sequenzen in allen Pavianzellen nachgewiesen werden konnten und zum Teil auch in der DNA von anderen Affen der alten Welt sowie des Menschen Homologien besitzt (6,7). Untersuchungen BEV-verwandter viraler Sequenzen in Primaten haben gezeigt, daß diese Sequenzen seit Millionen von Jahren übertragen werden (8,9,10) und daß sich anhand von Hybridisierungsexperimenten und dem daraus erhaltenen Grad der Nucleinsäurehomologien recht genau die evolutionäre Verwandtschaft der verschiedenen Primaten-Spezies feststellen läßt.

Die große Zahl der Retrovirus-bedingten Erkrankungen bei Tieren legt die Frage nach dem Vorhandensein eines humanen Oncovirus nahe. Vor allem die Isolierung von Retroviren aus Primaten hat die Forschung auf diesem Gebiet intensiviert.

Bei der Suche nach einem möglichen humanen Oncovirus wurden verschiedene Wege beschritten. Zum einen wurde von interspezies-spezifischen Eigenschaften aller Retroviren, wie z.B. Morphologie, Vorhandensein von Reverser Transcriptase usw., ausgegangen, zum anderen wurden die biochemischen und immunologischen Ähnlichkeiten von Viren verwandter Spezies benutzt, um einen Hinweis auf Retroviren im Menschen zu finden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von humanem Gewebe und Körperflüssigkeiten auf C-Typ-Partikel-ähnliche Strukturen wurden seit den 50er Jahren unternommen und waren bis auf eine Ausnahme vergeblich: 1973 gelang es Kalter, in einer normalen menschlichen Plazenta C-Typ Partikel nachzuweisen (37). Dies war ein wichtiger qualitativer Befund, der wegen seiner Einmaligkeit jedoch kaum Konsequenzen nach sich zog. Zudem erwies es sich als unmöglich, Plazenta-Gewebe in Kultur zu nehmen, um dann eine Virus-

produktion zu induzieren oder infektiöse Partikel aus humanem Gewebe zu isolieren (60). Ein großer Nachteil der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist ihre Ungenauigkeit. Sie verlangt große Mengen von Virus im Untersuchungsmaterial und nur sporadisch freigesetzte Partikel können in der Überfülle des negativen Materials leicht untergehen.

Eine zweite Möglichkeit, humane C-Typ-Partikel zu suchen, ist mit den gleichen schlechten Voraussetzungen behaftet: Der Nachweis der in allen Retroviren vorkommenden Reversen Transcriptase. Auch hier besteht nur dann Aussicht auf Erfolg, wenn das Enzym in genügend hohen Quantitäten vorhanden ist. 1978 berichteten Nelson et al. (11) von einer leichten Polymerase-Aktivität, die sie in 80 % der von ihnen untersuchten menschlichen Plazenta-Extrakte fanden.

Neuere Untersuchungen (46,54) haben gezeigt, daß trotz einer elektronenoptisch nachweisbaren Virusproduktion in Teratocarcinomzellen kaum RT-Aktivität zu finden ist und die Möglichkeit von defekten Partikeln, wie sie auch bei Mäusviren als Mutanten vorkommen können (56), wird in diesem Zusammenhang diskutiert.

Hybridisierungsexperimente mit viraler RNA oder cDNA und menschlicher DNA haben ergeben, daß 10 % - 20 % des BEV-Genoms mit humaner DNA hybridisieren, jedoch mit sehr geringer Affinität. Aufgrund der Hybridisierungsergebnisse, die mit Restriktionsenzym-behandelter menschlicher DNA und BEV-RNA erhalten wurden, wird vermutet, daß verwandte Sequenzen nur vereinzelt in kurzen Stücken im humanen Genom vorkommen (57).

Hybridisierungen mit Nucleinsäuren anderer Retroviren wurden nicht beobachtet.

Die sensitivste Methode zur Suche eines möglichen humanen RNA-Virus ist die Anwendung von radioimmunologischen Techniken, um Antikörper gegen virale Strukturproteine in humanen Seren oder virale Antigene in Gewebe oder Körperflüssigkeiten von Menschen zu finden. Das Auftreten natür-

licher Antikörper gegen endogene Viren in gesunden Mäusen und Katzen wurde schon in den frühen siebziger Jahren von mehreren Gruppen berichtet (12-14). 1976 veröffentlichten Weislow et al. (15) Ergebnisse über Antikörper gegen BEV in Seren von normalen Pavianen. Da eine offene Virusreplikation zumindest in der Plazenta von Pavianen bekannt ist, bedeutet dieses Ergebnis, daß die Paviane nicht tolerant sind gegenüber ihrem eigenen endogenen Virus.

Des weiteren lassen diese Ergebnisse die Suche nach Antikörpern gegen Primaten-Viren in humanen Seren sinnvoll erscheinen. Dabei macht man sich das Vorhandensein der interspezies-spezifischen Determinanten auf den Virus-Strukturproteinen zunutze und versucht, über eventuell vorhandene Kreuzreaktionen Hinweise auf Virus-spezifische Antikörper zu erhalten. Auf diese Weise konnte von verschiedenen Labors eine Immunreaktion in menschlichen Seren gegen Primaten-Oncoviren festgestellt werden (16-19), andere Arbeitsgruppen veröffentlichten negative Ergebnisse (20,60).

Die ersten derartigen Untersuchungen wurden mit vollständigen oder Detergens-behandelten Viren unternommen, wobei das Hauptaugenmerk auf das exogene Simian-Sarkom-Virus (SSV) und dessen assoziiertes Helfervirus (SSAV) gerichtet wurde (16,20). Spätere Studien befaßten sich dann mit der genauen Spezifität der menschlichen Immunantwort und stellten positive Reaktionen gegen das p30 und in besonderem Maße gegen das gp70 (siehe Tabelle 2) von SSV/SSAV fest (17,21). Kurth und Schmitt (21) berichteten auch von einem leichten Antikörpertiter gegen BEV-Gesamtvirus. In keiner der veröffentlichten Arbeiten konnte die humane Immunreaktion auf eine bestimmte Patientengruppe oder auf Seren mit spezifischen Merkmalen (Alter, Blutgruppe etc.) eingegrenzt werden. Die starke Reaktion gegen das gp70 ist nicht verwunderlich, wenn man die morphologisch exponierte Stellung des Proteins außen auf der Virushülle (siehe Abb. 1) bedenkt,und stimmt überein mit der Spezifität natürlicher anti-viraler Antikörper in Mäusen und Katzen (22,23).

Die vorher angedeuteten kontroversen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wurden inzwischen dahingehend berichtigt, daß auch von diesen Labors mit modifizierten und verfeinerten Methoden Antikörper gegen SSV/SSAV gp70 nachgewiesen wurden (24).

Weitergehende Untersuchungen über die Spezifität der Immunreaktion in Menschen und Tieren haben dann zu Ergebnissen geführt, die vermuten lassen, daß die natürlich vorkommenden Antikörper weitestgehend und möglicherweise ausschließlich gegen die Kohlehydrat-Determinanten des aus einem Zucker- und einem Proteinanteil zusammengesetzten Glycoproteins gerichtet sind (24-27).

Ungeachtet der Schlüsselrolle des Hüll-Glycoproteins der Oncoviren in Bezug auf Infektiosität und Antigenität eines Virus ist bis jetzt wenig bekannt über seine Struktur. Es wird allgemein angenommen, daß die Glycosylierung des Proteins ein Zell-codierter Prozeß ist, d.h. daß die Zuckerdeterminante zellspezifisch ist. Es sind aber auch Arbeiten bekannt, die zeigen, daß das Retrovirus-Genom offenbar doch einen Einfluß auf die Glycosylierung des Proteins ausübt. Demnach wäre die Struktur des Zuckeranteils des Glycoproteins nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, zellbedingt (28). Es ist offensichtlich, daß die Frage der Kontrolle der Glycosylierung des Hüllproteins eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Antigenität eines Virus spielt. Eine Zell-codierte Glycoprotein-Struktur würde das Auftreten autologer Antikörper unwahrscheinlich machen, denn ein Organismus reagiert in der Regel nicht mit einer Immunantwort auf körpereigene Strukturen.

Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, ob beim Menschen Antikörper existieren, die mit gereinigten Strukturproteinen endogener Primatenviren (gp70 und p30) reagieren können. Wie weiter oben schon erwähnt, ist für diese Untersuchungen das endogene Pavianvirus BEV als vertikal übertragenes Primaten-Retrovirus besonders interessant, weil Kreuzreaktionen zu endogenen Humanviren denkbar sind.

Mit Hilfe der hochsensitiven Radioimmunotests wurden menschliche Seren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen die Strukturproteine p30 und gp70 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Immunantwort gegen das Hüllprotein gp70 existiert, nicht jedoch gegen das innere Kernschalenprotein. Im Hinblick auf die noch nicht geklärte Frage nach der Spezifität gegen Glycoproteine anderer Primaten-Viren gerichteter Antikörper wurde versucht, diese positive Reaktion mit verschiedenen Agentien zu kompetitieren oder durch enzymatischen Verdau der Zuckerdeterminante zu eliminieren. Die Viren, deren gereinigte Proteine als Antigene verwendet wurden, sind in Zellen verschiedener Spezies gezüchtet worden, um auch die Auswirkungen verschiedener Zell-bedingter Glycosylierungen zu untersuchen.

2. M A T E R I A L

2.a. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Plastikpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Glas-Rührflaschen für Gewebekultur	Bachofer, Reutlingen
Isotopen (Na-^{125}J)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Phosphocellulose p-11	Whatman Ltd., Maidstone, Kent, GB
CNBr-aktivierte Sepharose	Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg
DEAE-Sepharose	"
Sephadex G-25	"
Acrylamid	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
N,N-Methylenbisacrylamid	"
α-Methyl-D-Mannoside	Sigma, München
Transferrin	"
N-Acetylneuraminsäure	"
Amidoschwarz	"
Lectin von Lens culinaris	"
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Nonidet P 40	Shell Chemicals, Stuttgart
Triton-X-100	Packard Instruments Comp., Illinois, USA
Filter	Schleicher + Schüll, Dassel
N,N-Bis-(2-hydroxäthyl)-2-aminoäthansulfonsäure	EGA-Chemie, Steinheim

β-Mercaptoäthanol	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Siliconlösung	"
N-Acetylneuraminidase	Miles GmbH, Frankfurt
Endoglucosidase H	"

2.b. Medien

Eagle's Medium	Gibco, Karlsruhe
Joklik's Medium	"
Fötales Kälberserum	Seromed, LS-Labor-Service, München

Trypsin:

Rezept für 5 l	NaCl	40,0 g
	KCl	1,0 g
	KH_2PO_4	1,0 g
	$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	5,75 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5 g
	Trypsin-Versen Titriplex I	6,25 g
	Streptomycin	0,5 g
	Penicillin	500000 U

PBS pH 7,2:

Rezept für 5 l	NaCl	50,0 g
	KCl	1,25 g
	Na_2HPO_4	7,19 g
	KH_2PO_4	1,25 g

EDTA pH 7,2:

Rezept für 1 l	NaCl	8,0 g
	KH_2PO_4	0,2 g
	KCl	0,2 g
	Na_2HPO_4	1,15 g
	EDTA	0,2 g

2.c. Seren

Zur Antikörper-Untersuchung wurden Seren von Gesunden verwendet und von Patienten mit folgenden Erkrankungen:

Leukämien:	akute myeloische Leukämie chronische myeloische Leukämie chronische lymphatische Leukämie
Lymphome:	Lymphome sind Lymphknotengeschwulste Es wurden nur Seren von Patienten mit malignen Lymphomen verwendet
Morbus Hodgkin:	M.H., auch Lymphogranulomatose genannt, ist eine Krankheit des lymphoretikulären Systems, deren mögliche virale Ätiologie durch die Entdeckung von Reverser Transcriptase und einer 20s RNA (44) in M.H.-Gewebe diskutiert wird.
Chorea Huntington:	C.H. ist eine heredodegenerative Erkrankung mit Veränderung der Ganglienzellen des Striatium und der Hirnrinde. Aufgrund regionaler und familiärer Anhäufung von Krankheitsfällen wurde eine virale Ätiologie nicht ausgeschlossen.
Blasenmolen:	Blasenmolen werden unter anderem als Vorstufen des malignen Chorionkarcinoms angesehen und entstehen in der Regel aus Plazentaresten im Uterus.
Teratokarcinome und Embryonale Carcinome:	Diese Geschwulste gehören zu den Germinoblastomen oder Keimzelltumoren. Teratokarcinome enthalten Zellen aller drei Keimblätter, während Embryonale Carcinome (EC) nur aus undifferenzierten Stammzellen bestehen. Bei einigen Teratokarcinomzellen ist inzwischen eine Retrovirus-Produktion nachgewiesen worden (46, 53,54).

Die untersuchten Seren wurden erhalten von:

Blutspender:	Dr. Schunter, Blutspendezentrale, Tübingen
Labor-mitarbeiter:	Friedrich-Miescher-Laboratorium, Tübingen

Nabelschnurblut:	Prof. Schindler, Univ.-Frauenklinik, Tübingen
Schwangere:	Prof. M. Essex, Harvard School or Public Health, Boston, USA
Leukämien:	Dr. Weber, St. Gallen, Schweiz Dr. Wernet, Med. Universitätsklinik, Tübingen
Lymphome:	Prof. Lennart, Universität Kiel Dr. Bartels, Universität Lübeck
Chorea Huntington:	Dr. Barkley, Univ. of California, Los Angeles, USA
M. Hodgkin:	Dr. Ebbesen, Univ. Kopenhagen, Dänemark
Blasenmolen:	Prof. Schindler, Univ.-Frauenklinik, Tübingen
Teratokarcinome und Embryonale Carcinome:	Dr. Pfeiffer, Med. Klinik, Essen Dr. Harzmann, Chirurg.-Univ.-Klinik, Tübingen

Ziegenseren gegen Oncoviren verschiedener Spezies:

Dr. J. Gruber, National Institutes of Health/National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA

Ziege-anti-BEV(M7)-Serum und normales Ziegenserum:

Dr. J. Löwer, Prof. Dr. R. Kurth, Friedrich-Miescher-Laboratorium, Tübingen

Antigen SSAV gp70:

Prof. Dr. W. Schäfer und Dr. H.-J. Thiel, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

2.d. Zellen

CF0002

CF0002 ist eine uninfizierte Hundethymuszelle (50). Sie wurde in Eagle's Medium, angereichert mit 7,5 % FKS, in 90 mm-Petrischalen gehalten. Zum Passagieren und Vermehren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit einer 0,25 %-igen Trypsinlösung von Plastik abgelöst und 1:3 verdünnt neu ausgesät.

M7-CF0002

M7-CF0002-Zellen sind Hundethymuszellen (s.o.), die mit dem M7-Isolat von BEV durch Kokultivierung infiziert wurden (52). Die Zellen produzieren BEV. Die Zell-Haltung und -Vermehrung erfolgte wie für CF0002 beschreiben. Zur Virusernte wurden die Zellen in Plastik-Rollerflaschen (850 cm^2) kultiviert.

M7-A204

M7-A204 ist eine humane Rhabdomyosarkom-Zellinie (51), die mit dem zellfreien, virushaltigen Extrakt einer Pavian-Plazenta (Isolat M7) infiziert wurde.
Die Zellinie wächst als Suspensionskultur und produziert BEV. Sie wurde in Joklik's Medium, angereichert mit 7,5 % FKS, gehalten.
Zum Passagieren und Vermehren wurden die Zellen 20' mit 1500 g sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in frischem Medium resuspendiert. Die optimale Zelldichte beträgt 2 - 3 x 10^5 Zellen/ml Medium.

3. METHODEN

3.a. Virusernte und -reinigung

Zellkulturmedium von Virus-produzierenden Zellen wurde alle 24 h abgenommen und Zellreste 15' mit 8000 g sedimentiert. Der Überstand wurde dann 90' mit 50000 g zentrifugiert und das dadurch erhaltene Viruspellet in TM-Puffer resuspendiert.

TM-Puffer: 0,01 M Tris-Hcl pH 7,2
5 mM $MgCl_2$

Die weitere Reinigung der Virussuspension erfolgte durch Zentrifugation in einem Sucrosegradienten (20 % - 55 % Saccharose in TM-Puffer) für 2 h mit 50000 g im Vertikalrotor. Nach Fraktionierung der Gradienten und Bestimmung der Dichte der Fraktionen im Refraktometer wurden die virushaltigen Fraktionen (Dichte 1.17 - 1.15) nochmals zentrifugiert (90', 50000 g) und das so erhaltene Pellet zur Protein-Reinigung verwendet.

3.b. Reinigung der Virusstrukturproteine

Dichtegradienten-gereinigtes Virus (siehe 3.a.) wurde in Detergens-haltigem Puffer für 15' suspendiert und anschliessend 30" beschallt.

Puffer: 0,01 M Tris-HCl pH 8.0
0,01 M NaCl
0,2 mM EDTA
0,1 % Triton X-100
0,01 % Na-Azid

Die unlöslichen Proteine wurden 60' bei 100000 g sedimentiert. Um die gelösten Proteine zu fällen, wurde dem Über-

stand das 4-fache seines Volumens Aceton langsam und tropfenweise in Eis zugegeben und das Gemisch anschließend 15' mit 20000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer (s.o.) resuspendiert und auf eine Linsen-Lectin-Säule aufgetragen, welche mit dem gleichen Puffer equilibriert worden war. Der Durchlauf der Säule enthielt unter anderem das Virusstrukturptotein p30, während das gp70 durch seinen Kohlehydratanteil an der Säule haftet und mit 1 M α-Methyl-D-mannosit in Puffer eluiert wurde.

Die weitere Reinigung des p30 erfolgte über eine Ionenaustauscher(Phosphocellulose)-Säule. Dazu wurde der Durchlauf der Linsen-Lectin-Säule dialysiert gegen 10 mM BES pH 6,5, 1 mM EDTA. Die Säule wurde zuerst mit 1 M BES pH 6,5 equilibriert, bis der pH 6,5 erreicht ist. Anschließend wurde mit 10 mM BES pH 6,5, 1 mM EDTA gewaschen, bis eine möglichst niedrige Leitfähigkeit (30 - 40 µS) erreicht war, und dann die Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten steigender KCl-Molarität, in der Regel von 0,0 - 0,7 M KCl in Puffer. Da die Molarität der einzelnen Fraktionen nicht direkt bestimmt werden konnte, wurde ihre Leitfähigkeit mit Hilfe eines Konduktometers gemessen und die Werte anhand einer vorher erstellten Eichkurve umgerechnet. Die p30 enthaltenden Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lokalisiert, gegen 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Das Glycoprotein enthaltende Eluat der Lectin-Säule wurde über eine DEAE-Sepharose-Säule weiter gereinigt. Die Säule wurde zuvor equilibriert mit dem gleichen Puffer, wie für die Lectin-Säule beschrieben (s.o.). Die Probe wurde ohne vorhergehende Dialyse auf die Säule aufgetragen und das Protein mit einem Gradienten steigender NaCl-Molarität (0,0 - 0,7 M) eluiert. Die Molarität der einzelnen Fraktionen wurde wiederum mit Hilfe der Leitfähigkeitsmessung bestimmt. Die gp70-haltigen Fraktionen wurden durch Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel lokalisiert, gegen 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

3.c. Protein-Bestimmung

Protein-Bestimmungen wurden nach der Methode von Schaffner und Weissmann (48) wie folgt durchgeführt:

0,27 ml Probe (zwischen 3 und 30 µg Protein, eventuell mit H_2O verdünnt) wurden mit 0,03 ml 1 M Tris pH 7,5, 1 % SDS und 0,1 ml 60 %iger TCA versetzt. Nach etwa 2 Minuten wurde die Probe durch Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und mit 0,5 ml 6 %iger TCA nachgespült.

Der Proteinniederschlag wurde mit 0,5 ml einer 0,1 %igen Amidoschwarz-Lösung (Amidoschwarz in Methanol-Eisessig-H_2O 5:1:5) angefärbt und die überschüssige Farbe mit 2 ml Methanol-Eisessig-H_2O 5:1:5 ausgewaschen.

Die gebundene Farbe wurde mit 0,6 ml 0,1 n NaOH 30 Minuten abgelöst und die Extinktion bei 630 nm im Spektralphotometer gemessen.

Der Proteingehalt der Proben wurde anhand einer Eichkurve, die mit entsprechenden BSA-Konzentrationen hergestellt wurde, bestimmt.

3.d. Lectin-Kopplung

Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B (1 g/10 mg lyophil. Lens culinaris Lectin) wurde mit 1 mM HCl (200 ml/g Sepharose) gewaschen, wobei der Waschvorgang etwa 15' dauerte.

Das zu bindende Linsen-Lectin, aufgenommen in

0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3
0,5 M NaCl
0,1 M α-Methyl-D-mannosit

wurde sofort nach dem Waschen zugegeben und die Mischung 2 h bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde die Sepharose vorsichtig für 10' bei 200 g sedimentiert und in 1 M Äthanolamin in oben genanntem Puffer aufgenommen.

Nach 2-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde zuerst mit 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3 gewaschen, bis der pH 8,3 erreicht war, dann mit 0,1 M Na-Acetat pH 4,0 ebenso verfahren.

Die Lectin-Sepharose wurde bis zum Gebrauch in PBS + 0,01 % Na-Azid aufbewahrt.

3.e. IgG-Reinigung

Serum einer mit BEV-produzierenden autologen Zellen immunisierten Ziege wurde mit 6 ml kalt-gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung langsam und tropfenweise versetzt. Zur vollständigen Präzipitation der Proteine wurde das Gemisch anschliessend 4 h bei 4°C gerührt und das Präzipitat bei 25000 g 20' sedimentiert. Das Pellet wurde in wenigen ml halbgesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung aufgenommen und nochmals 20' bei 25000 g zentrifugiert. Das so erhaltene, gewaschene Sediment wurde in 3,5 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung aufgenommen und 4 h mit 3-maligem Pufferwechsel gegen 0,0175 M Natriumphosphat-Puffer dialysiert. Nach Beendigung der Dialyse wurden die ausgefallenen Proteine 20' bei 20000 g sedimentiert und der Überstand auf eine DEAE-Säule gegeben, die vorher mit dem gleichen Puffer equilibriert wurde. Eluiert wurde ebenfalls mit 0,0175 Na-Phosphat. Das gereinigte IgG (1. Elutionspeak) wurde gegen 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3, 0,5 M NaCl dialysiert und nach der Dialyse der Proteingehalt bestimmt.

3.f. Immunoadsorbent-Säule

25 mg des gereinigten Anti-BEV-IgG wurden an 3 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt. Die Kopplung erfolgte wie unter 3.d. für das Lectin beschrieben. Als Puffer wurde ver-

wendet: 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3 + 0,5 M NaCl. Nach der Kopplung wurde mit der Sepharose eine kleine Säule (0,5 x 6 cm) angesetzt und diese equilibriert mit:

0,01 M Tris-HCl pH 8,0
0,2 mM EDTA
0,01 M NaCl
0,1 % Triton X-100

Vorgereinigtes ^{125}J-markiertes BEV gp70 (siehe 3.i.) wurde zur weiteren Reinigung auf die Säule aufgetragen und das gebundene Protein mit 4,0 M $MgCl_2$ eluiert. Nach sofortiger Dialyse des Eluats gegen den oben genannten Puffer wurde das BEV gp im SDS-Polyacrylamidgel auf seine Reinheit geprüft und dann im RIA eingesetzt.

3.g. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurde mit Plattengelen gearbeitet, die aus zwei Phasen bestanden:

1. aus dem sogenannten Laufgel, das in der Regel mit einem kontinuierlichen Gradienten von 7,5 % - 20 % Polyacrylamid angesetzt wurde. Die Laufstrecke betrug etwa 12 cm.
2. aus einem 3 cm langen 5 %igem Konzentrierungsgel, auf welches die Proben aufgetragen wurden.

7,5 % Laufgel:	7,5	ml einer 30 %igen Acrylamidlösung
	10,0	ml 1 M Tris-HCl pH 8,9
	0,15	ml 20 % SDS
	12,5	ml H_2O
	100	µl 10 % Ammoniumpersulfat
	20	µl TMED
20 % Laufgel:	20,0	ml einer 30 %igen Acrylamidlösung
	10,0	ml 1 M Tris-HCl pH 8,8
	0,15	ml 20 % SDS
	100	µl 10 % Ammoniumpersulfat
	20	µl TMED

5 % Konzentriergel:

1,67 ml einer 30 %igen Acrylamidlösung
1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
7,03 ml H_2O
50 µl 20 % SDS
50 µl 10 % Ammoniumpersulfat
10 µl TMED

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in folgendem Puffer:

17,3 g Glycin
6,0 ml 20 % SDS
mit 1 M Tris pH 8,3 einstellen
ad 1200 ml H_2O

Vor dem Auftragen wurden die Proben in einem Puffer aufgenommen, der β-Mercaptoäthanol enthielt zur Reduktion der Proteine und Bromphenolblau zum Sichtbarmachen der Laufgrenze.

Probenpuffer:

10 ml 20 % SDS
10 ml Glycerin
8 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
1 ml 0,2 M PMSF in Propanol-2
62 ml dest. H_2O
1 ml 0,2 % Bromphenolblau
5 ml β-Mercaptoäthanol

Die Proben wurden in dem Puffer für 3' in kochendem Wasser inkubiert und dann aufgetragen. Die Spannung betrug zu Beginn der Elektrophorese 150 mV und wurde auf 400 mV erhöht, sobald sich die Proben am oberen Rand des Laufgels konzentriert hatten. Um die Proteine anzufärben, wurde das Gel nach Beendigung des Laufs für 1 h in Färbelösung inkubiert.

Färbelösung:

200 ml Methanol
70 ml Eisessig
60 g Trichloressigsäure
750 ml H_2O
50 ml 2 % Coomassie Brilliant Blue

Anschließend wurde die nicht an Proteine gebundene Farbe wieder eluiert.

Elutionslösung: 300 ml Methanol
700 ml H_2O
50 ml Eisessig

Die Elutionslösung wurde mehrere Male gewechselt, bis die Gelmatrix vollständig entfärbt war.

3.h. PAS (Periodic acid Schiff)-Färbung

Zur selektiven Anfärbung von Glycoproteinen wurden Polyacrylamidgele vor der Coomassie-Proteinfärbung einer PAS-Färbung unterzogen (49). Dazu wurden die Polyacrylamidgele in 1 M CH_3COOH 30 Minuten inkubiert und anschließend 30 sec. in H_2O gewaschen. Danach wurde 1 h in 1 %iger Perjodsäure, gelöst in 3 % CH_3COOH (frisch angesetzt), unter leichtem Schwenken inkubiert und das Gel dann über Nacht gewässert. Die Färbung erfolgte am nächsten Tag durch Inkubation in Schiffs-Reagenz für 1 h im Dunkeln wieder unter leichtem Schwenken. Danach wurde 10' mit 0,5 % K-Metabisulfit, gelöst in 0,15 M HCl, gewaschen, anschließend mit H_2O einige Male gespült und in 7 %iger CH_3COOH aufbewahrt oder zur Kontrolle mit Coomassie-Blue gefärbt.

3.i. Radioaktive Markierung mit $Na^{125}J$

Zu je 10 - 30 µl (10 - 30 µg Protein) einer Proteinlösung wurde je 1 mCi $Na^{125}J$ gegeben und die Jodierungsreaktion durch Zugabe von 10 µg Chloramin T, gelöst in 10 µl Boratpuffer pH 8,2, gestartet. Nach 2 Minuten wurde der Prozeß durch die Zugabe von 30 µg $Na_2S_2O_5$ in 10 µl Boratpuffer beendet und das Reaktionsgemisch auf eine Sephadex G-25-Säule gegeben (1 x 10 cm Säulenvolumen, equilibriert mit PBS + 0,5 mg/ml Myoglobin + 0,5 % Triton), um das markierte Protein von nichtgebundenem ^{125}J abzutrennen. Eluiert

wurde mit dem oben genannten Puffer. Man erhielt zwei Radioaktivitätspeaks, wobei der zuerst eluierte das markierte Protein enthielt und der folgende das ungebundene Jod. Da mit dem Protein in der Regel auch etwas freies Jod eluiert wurde, wurde die tatsächliche Ausbeute von markiertem Protein durch eine TCA-Fällung festgestellt.

Boratpuffer:	H_3BO_3	10,3 g/l
	NaOH	1,1 g/l
	NaCl	7,85 g/l
	pH 8,2	

3.k. Herstellen von Zellysaten

Von Monolayer-Zellen in der Gewebekultur-Petrischale wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit Hilfe einer 0,02 %igen EDTA-Lösung in PBS von der Schale gelöst. Um die Zellen zu sedimentieren, wurde dann 10' bei 1200 g zentrifugiert. Suspensionszellen wurden sofort 10' bei 1200 g sedimentiert.

Das Zellpellet wurde im Lysepuffer aufgenommen (1 ml Puffer/10^7 Zellen).

Puffer:	0,01 M Tris-HCl pH 7,2
	0,1 M NaCl
	1 % NP40
	2 mM PMSF
	200 U/ml Trasylol

Das Zell-Puffer-Gemisch wurde 10' bei $4^{\circ}C$ inkubiert und anschließend 30' mit 100 000 g zentrifugiert, um die unlöslichen Teile zu entfernen.

Der Überstand enthielt dann die löslichen Zellproteine und wurde nach vorheriger Proteinbestimmung im RIA-Kompetitionstest eingesetzt.

3.1. Radioimmunopräzipitationstest (RIA)

10 µl verdünntes ^{125}J-markiertes Virusstrukturprotein (p30 bzw. gp70) wurde entweder mit 10 µl menschlichem Serum oder als positive Kontrollen mit anti-viralen Tierseren für 1 h bei 37°C und 2 h bei 4°C inkubiert, bevor zur Vernetzung der Antigen-Antikörperkomplexe ein 20-facher Überschuß von spezifischen anti-IgG-Antiseren zugesetzt wurde. Nach erneuter Inkubation 1 h bei 37°C und über Nacht bei 4°C wurden die Immunkomplexe 5' bei 200 g sedimentiert und 2 x mit 400 µl RIA-Puffer:Probenröhrchen gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurde jeweils 1 h bei 37°C und 2 h bei 4°C inkubiert. Die präzipitierte Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler gemessen.

Als Probenröhrchen wurden silikonisierte Plastikröhrchen verwendet.

Der RIA-Puffer für die Verdünnungen und das Waschen der Sedimente bestand aus PBS, dem Ca^{2+} (4 mM) und Mg^{2+} (2,5 mM) zugesetzt wurden, sowie 0,5 mg/ml Myoglobin als Trägerprotein und 0,5 % Triton-X-100.

Um die Titrationskurve eines humanen oder animalen Serums zu erstellen, wurde das Serum in steigenden Verdünnungen als 1. Antikörper zugesetzt. In der Regel wurde in Vierer-Schritten verdünnt. Der 2. Antikörper (=anti-Immunglobulin) wurde dementsprechend ebenfalls verdünnt.

3.m. Kompetitionstests

10 µl (Einzelsubstanzen) oder 100 µl (Zellysat) des kompetitierenden Agens wurden in zunehmenden Verdünnungen mit 10 µl einer gleichbleibenden Konzentration des zu kompetitierenden 1. Antikörpers 1 h bei 37°C und 2 h bei 4°C inkubiert, bevor je 10 µl des markierten Antigens zugegeben wurden. Danach folgten die Inkubations- und Waschvorgänge wie unter 3.1. beschrieben.

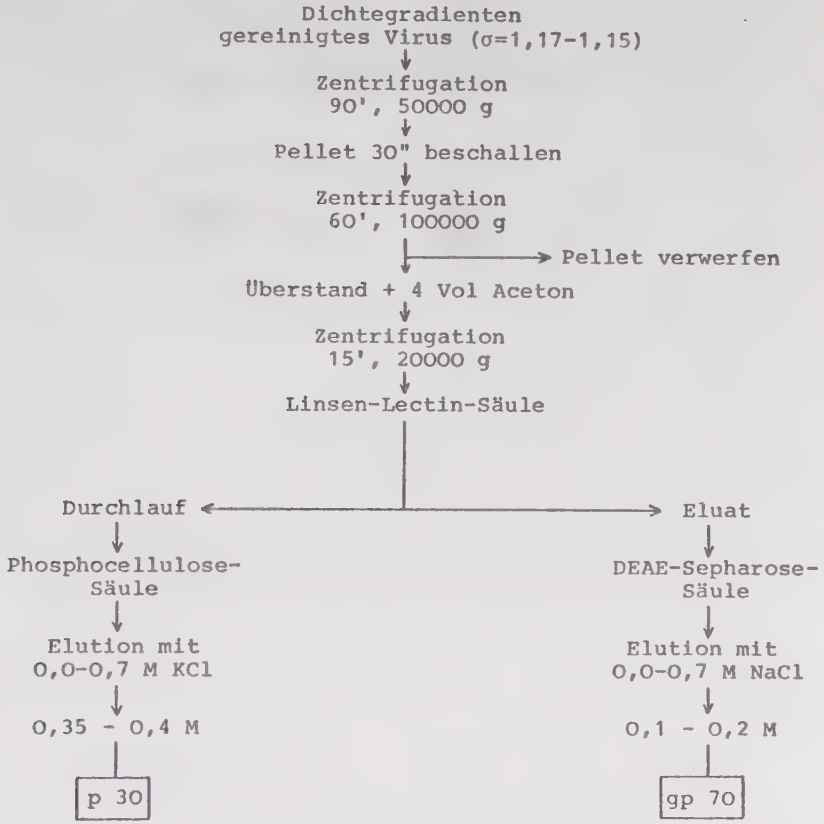
3.n. Glycosidase-Verdau

3 x 10^6 cpm ^{125}J-markiertes Glycoprotein in 0,2 M Na-Acetat + 2 mM Ca^{2+}, pH 5,3, wurden für 16 h bei 37°C inkubiert mit 0,25 U Neuraminidase und 0,01 U Endoglycosidase H von Streptomyces griseus. Als Kontrolle für Verunreinigungen des Ansatzes mit Proteasen wurden 10 µg BSA in der gleichen Weise inkubiert. Der Erfolg der Deglycosylierung wurde anhand von SDS-Polyacrylamidgel-elektrophoretischer Auftrennung eines Aliquots jeder Probe überprüft.

4. E R G E B N I S S E

4.a. Virusproteinreinigung

Die Reinigung der Strukturproteine p30 und gp70 des BEV erfolgte nach folgendem Schema:



Es wurde Virus aus Zellen zweier verschiedener Spezies gereinigt:

a) von der mit dem BEV-M7-Isolat infizierten Hundethymuszelle CF0002 = M7-CF0002
b) von der mit dem gleichen Isolat infizierten menschlichen Rhabdomyosarkomlinie A204 = M7-A204.

Dabei betrug die Menge an Dichtegradienten-gereinigtem Virus pro Aufarbeitung etwa 15 mg, von denen in der Regel 2/3 trotz der vorhergehenden Reinigungsschritte noch Verunreinigungen waren. Diese bestanden zum einen aus zellulären Proteinen, zum anderen war durch die Zugabe von FKS zum Nährmedium sehr viel Rinderserumalbumin im Zellkulturüberstand.

Das Resultat der einzelnen Aufarbeitungsschritte wurde mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelen überprüft. Abbildung 2 zeigt die einzelnen Schritte einer p30-Reinigung vom Virus-Zell-Proteingemisch bis zum reinen Strukturpotein. Bei einer Ausgangsmenge von etwa 5 mg Virusprotein wurden 200 µg reines p30 erhalten.

Wie frühere Untersuchungen von Bolognesi (32) und Thiel (33) gezeigt haben, löst sich das Glycoprotein gp70 sehr leicht von der Virusoberfläche ab und ist dann hauptsächlich in "löslicher" Form im Kulturmedium vorhanden. Untersuchungen mit ^{3}H-Glucosamin-markiertem Virus konnten diese Ergebnisse bestätigen. Ohne eine hochspezifische Immunoadsorbent-Säule, durch die vermittels an das Säulenmaterial gebundener anti-gp70-Antikörper das Glycoprotein aus dem Kulturmedium gewonnen werden kann, ist die Reinigung eines in so geringer Menge vorhandenen Proteins aus einem großen Volumen Medium sehr schwierig. Eine spezifische Immunoadsorbent-Säule stand jedoch erst gegen Ende der Versuche zur Verfügung, deshalb wurde das gp70 ebenso wie p30 aus dem Viruspellet zu reinigen versucht.

Da das Glycoprotein aber nur 10 % der gesamten Virusproteinmenge ausmacht und ein großer Teil noch vor dem Pelletieren des Virus im Kulturmedium verloren wird, ist nur

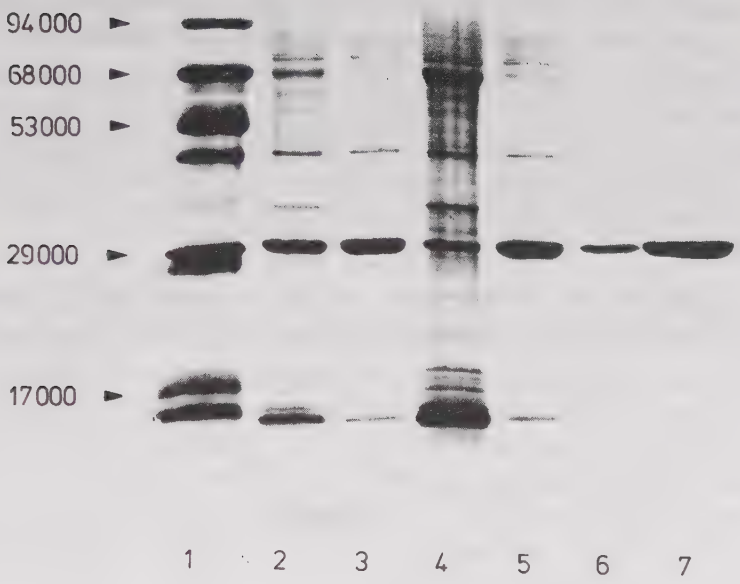


Abb. 2: SDS-Polyacrylamidgel der p30-Reinigungsschritte
1 - Standardproteine
2 - beschalltes Dichtegradienten-gereinigtes BEV
3 - Überstand nach 100000 g - Zentrifugation
4 - Sediment nach 100000 g - Zentrifugation
5 - Linsen-Lectin-Säulen-Auftrag
6 - " " " -Durchlauf
7 - Elution von p-11-Säule: 0,35-0,4 M KCl = p30

eine sehr geringe Ausbeute zu erwarten. Es wurden, ausgehend von 5 mg Virusprotein, etwa 20 µg gereinigtes gp erhalten, wenn Virus von M7/CF0002 Zellen isoliert wurde. Etwa 40 µg betrug die Ausbeute bei der Reinigung von gp aus Virus von M7/A204 Zellen. Die einzelnen Aufarbeitungsschritte wurden jeweils durch Aliquots auf SDS-Polyacryl-

amidgelen überprüft, die zur spezifischen Kenntlichmachung von Glycoproteinen vor der Coomassie-Proteinfärbung einer PAS(Periodic acid-Schiffs)-Färbung (siehe 3.h.) unterzogen wurden. War das Glycoprotein nach der Reinigung über die Linsen-Lectin-Säule und anschließender DEAE-Sepharose-Säule noch nicht frei von Kontaminationen (oft konnte durch diese beiden Schritte das BSA nicht vollständig entfernt werden), so wurde entweder nochmals über die Lectin-Säule gereinigt oder über eine Anti-BEV-Immunoadsorbent-Säule (siehe 3.f.). Diese letzten Reinigungsschritte wurden der geringen Proteinmenge wegen erst nach der radioaktiven Markierung mit ^{125}J durchgeführt.

Die markierten Proteine p30 und gp70 zeigten in der Autoradiographie keine Verunreinigungen mehr (Abb. 3). Das so-

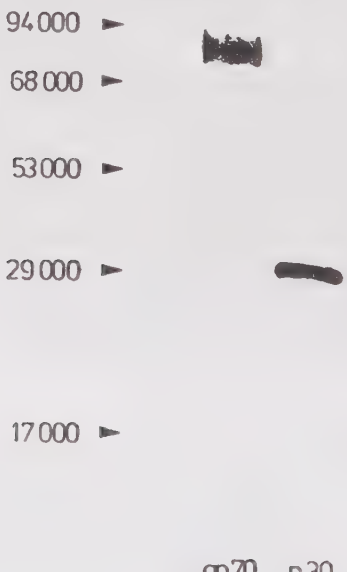


Abb. 3: Autoradiographie der gereinigten, ^{125}J-markierten BEV-Strukturproteine p30 und gp70

genannte gp70 hat ein leicht höheres Molekulargewicht als 70000, dies wurde auch schon von Bryant et al. (34) publiziert.

4.b. Radioimmunotests

Um die Antigenität der gereinigten, ^{125}J-markierten Proteine nachzuprüfen und Kreuzreaktionen mit anderen Viren auszuschließen, wurden Antiseren gegen verschiedene Säuger-Retroviren oder gegen ihre Strukturproteine im Radioimmunotest (RIA) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

Das p30 der C-Typ-Viren (Abbildung 4, Seite 30) besitzt Gruppen-, Typ- und interspezies-spezifische Determinanten. Aufgrund seiner Typspezifität reagiert das gegen das p30 des BEV-Isolats NC37 gerichtete Ziegenserum [●] mit dem angebotenen BEV p30, während die Seren gegen RD114[▲] (ein stark mit dem BEV verwandtes endogenes Katzenvirus) und FLV p30[○] die interspezies-spezifischen Determinanten erkennen. In einem wesentlich geringeren Ausmaß ist das gegen SSAV p30[□] gerichtete Ziegenserum in der Lage, BEV p30 zu präzipitieren. MPMV und BEV p30 besitzen kaum gemeinsame Determinanten. Deshalb präzipitiert das gegen MPMV p30 gerichtete Serum [■] ebensowenig markiertes BEV p30 wie das als Kontrollserum eingesetzte Serum einer nicht immunisierten Ziege NGS [△] .

Abbildung 5 (Seite 31) zeigt die Titrationsergebnisse für gp70. Während das Serum gegen BEV-NC 37 (ein anderes BEV-Isolat) [●] unverdünnt und in der ersten Verdünnung 100% der eingesetzten Radioaktivität präzipitiert, sind Seren gegen SSAV [▲] , FLV [■] und BoLV [□] nicht in der Lage, mit dem Antigen zu reagieren. Sie präzipitieren etwa 10% der eingesetzten Radioaktivität, ebenso wie das Kontrollserum einer nicht immunisierten Ziege NGS [△] . Anti-SMRV - Serum (siehe Tabelle 1) [○] präzipitiert unver-

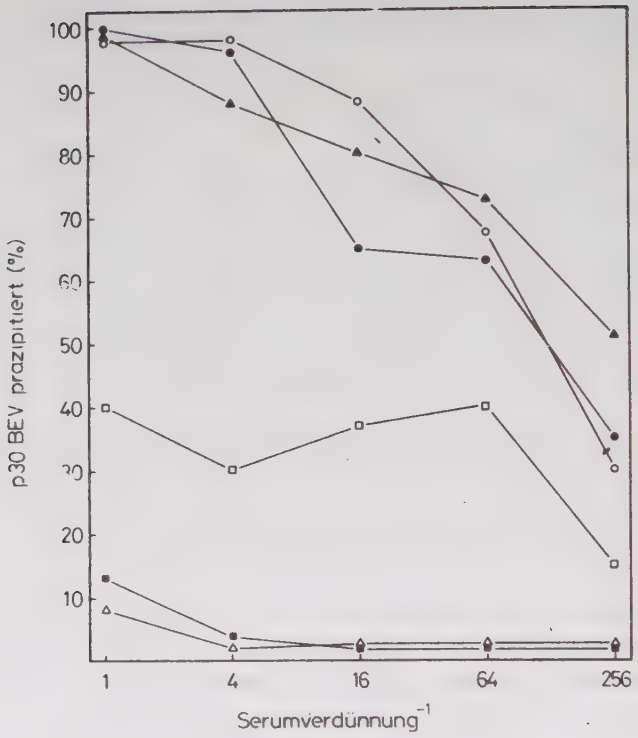


Abb. 4: Titration verschiedener animaler Immunseren gegen BEV p30.

● anti-BEV-NC37 p30
○ anti-FLV p30
■ anti-MPMV p28
□ anti-SSAV p30
▲ anti-RD114 p30
△ NGS

dünnt etwa 36 %. Diese immunologische Kreuzreaktion zwischen den Hüllproteinen von BEV und SMRV ist unlängst auch von anderen Gruppen beschrieben worden (35,36).

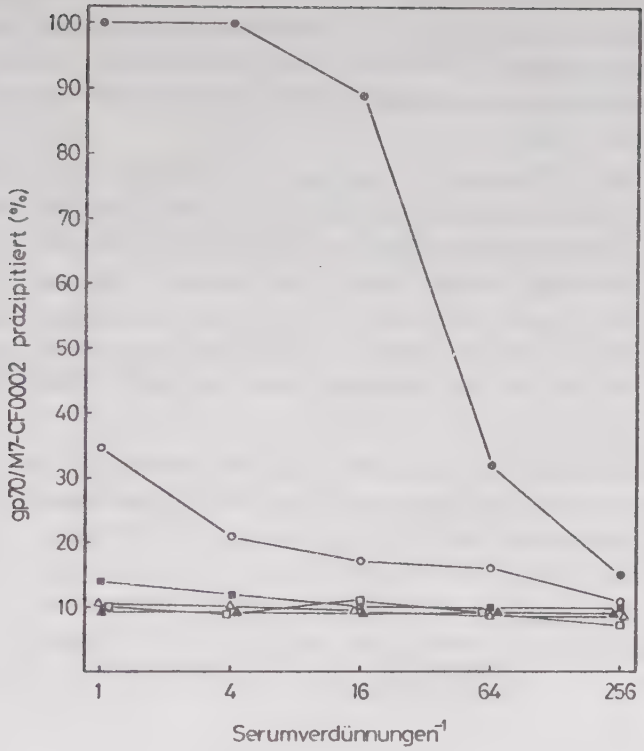


Abb. 5: Titration verschiedener Ziegen-Immunseren gegen BEV gp70

● anti-BEV-NC37 □ anti-BoLV
○ anti-SMRV ▲ anti-SSAV
■ anti-FLV gp70 △ NGS

Reaktivität humaner Seren gegen BEV p30

Es wurden Seren von gesunden Menschen als auch von Patienten mit verschiedenen Leukämien und anderen Tumoren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BEV p30 untersucht. Die Seren Gesunder stammten von Blutspendern beiderlei Geschlechts und verschiedener Altersgruppen, von Schwangeren

und von Nabelschnurblut. Von Patientenseren wurden untersucht: Seren von Männern mit Teratocarcinomen und Embryonalen Carcinomen, von Frauen mit Blasenmolen, Patienten mit Leukämien, mit Morbus Hodgkin und mit Huntington Disease (siehe 2.c.).

Keine der untersuchten Gruppen zeigte einen auffallenden Antikörpertiter gegen BEV p30, d.h. weder bei Gesunden noch bei Patienten konnten positiv reagierende Seren vermehrt in einer Gruppe lokalisiert werden. Als positiv wurden dabei solche Seren bezeichnet, die mindestens doppelt so viel radioaktives BEV p30 präzipitierten wie bekannt negative menschliche Kontrollseren und Seren nicht immunisierter Tiere.

Die folgende Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die untersuchten Seren und den Prozentsatz der Präzipitation eingesetzter Radioaktivität.

Tabelle 3: Aufstellung der gegen BEV p30 getesteten Seren und Prozentsatz der Präzipitation. Unspezifische Präzipitation in allen Ansätzen: 10 % - 15 %.

Seren	Anzahl getesteter Proben	Präzipitation < 10 %	10%-20%	>20 %
Blutspender	15	15	0	0
Nabelschnurblut	19	18	1	0
Schwangere	14	14	0	0
Leukämien	28	18	10	1
Blasenmolen	13	5	7	1
Teratocarc. + EC	36	33	2	1
M. Hodgkin	13	6	7	0
Huntington D.	15	2	13	0

Dabei kann festgestellt werden, daß zwar einige Seren mehr als 10 % des markierten Antigens präzipitieren, daß jedoch bei Kontrollwerten zwischen 10 % und 15 % diese Werte nicht als signifikant angesehen werden können. Eine Präzipitation von mehr als 20 % konnte in 3 Fällen beobachtet werden, diese Werte lagen jedoch nicht höher als 30 %. Aus diesen Daten kann nur der Schluß gezogen werden, daß eine spezifische humane humorale Immunität gegen p30 BEV nicht vorliegt.

Reaktivität humaner Seren gegen BEV gp70

Es wurden wiederum wie beim p30 BEV Seren Gesunder und von Patienten mit verschiedenen Krankheiten in den Tests eingesetzt. Als Antigen wurde ^{125}J-markiertes BEV gp70 verwendet, welches von BEV aus Zellen zweier verschiedener Spezies isoliert wurde: aus M7-A204 und aus M7-CF0002. Keines der untersuchten Humanseren zeigte eine positive Reaktion mit gp70/M7-A204, alle Präzipitationswerte bewegten sich im Bereich der negativen Kontrollseren.

Im Unterschied dazu erbrachten die Untersuchungen mit gp70/M7-CF0002 die in Tabelle 4 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 4: Aufstellung der gegen gp70/M7-CF0002 getesteten Seren und deren Präzipitation von gp70 (%)

Seren	Anzahl getesteter Proben	Ppt > 30%	Anzahl positiver Seren (%)
Blutspender	29	7	24,1
Labormitarbeiter	6	0	0
Schwangere	13	2	15,3
Nabelschnurblut	20	2	10
Lymphome	15	0	0
Leukämien	16	3	18,7
M. Hodgkin	14	6	42,8
Blasenmolen	3	1	33,3
Teratocarc. + EC	20	14	70,0

Um einen genaueren Überblick über die Verteilung der einzelnen Serumreaktionen in den verschiedenen Gruppen zu erhalten, wurde Abbildung 6 angefertigt. Jeder Punkt repräsentiert die Präzipitation durch ein individuelles Serum, unverdünnt gegen gp70/M7-CF0002 eingesetzt.

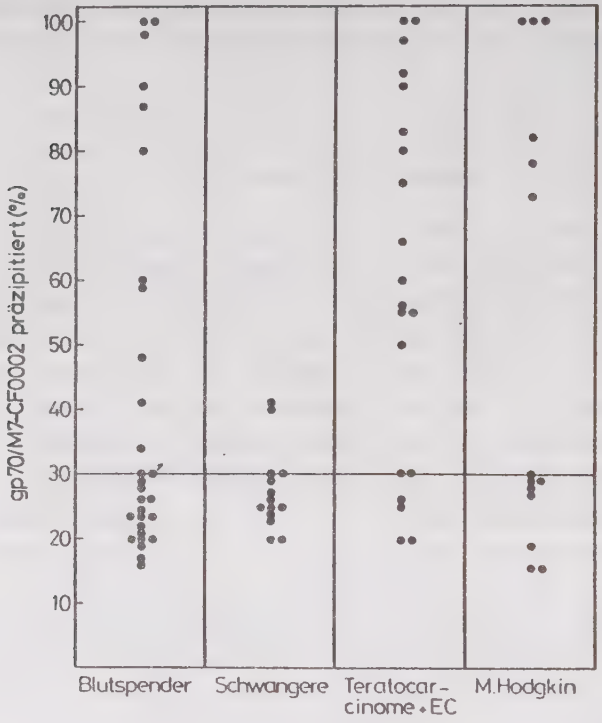


Abb. 6: Verteilung der Antikörperreaktivität gegen BEV gp70 in Humanseren am Beispiel von 4 ausgesuchten Gruppen

Spezifität der anti-viralen humanen Antikörper

Der Nachweis einer humoralen Immunreaktivität gegen BEV gp70 ließ eine genaue Untersuchung der Spezifität der verantwortlichen Antikörper wünschenswert erscheinen. Es sollte geklärt werden, ob antigene Determinanten im Protein- oder im Kohlehydratanteil des Glycoproteins erkannt werden. Aufgrund ihres besonders ausgeprägten Antikörpertiters wurden dazu hauptsächlich die Seren von Patienten mit Terato- und Embryonalen Carcinomen verwendet.

In Abbildung 7 ist der Titerverlauf einiger typischer Seren dargestellt (Seite 36).

Bei allen Tests wurden zwei "normale" Humanseren von Blutspendern miteingesetzt: NHS 1 als negative Kontrolle und NHS 2 als positives Vergleichsserum. Als 100 %-Präzipitat wurde die Menge an Radioaktivität angesehen, die von 10 µl unverdünnt eingesetzten Ziege-anti-NC37-Serums präzipitiert werden konnte. Alle Humanseren haben in der 2. Verdünnungsstufe (1:16) bereits das Niveau des negativen Kontrollserums erreicht. Ebenfalls zwischen 30 % und 40 % der eingesetzten Radioaktivität präzipitierte das normale (d.h. nicht immunisierte) Ziegenserum. Dieser sehr hohe Background wurde in allen Tests mit gp70/M7-CF0002 beobachtet und konnte auch durch intensives Waschen oder Wechsel des Kontrollserums nicht erniedrigt werden.

Um diese positiven Ergebnisse mit den Daten früherer Publikationen (16,17), in denen von Antikörpertitern vieler Humanseren gegen gp70 von SSAV berichtet wurde, zu vergleichen, wurde ein Teil der Seren (Teratocarcinome und Blutspender) auch gegen ^{125}J-markiertes gp70 von SSAV eingesetzt. Es zeigte sich, daß alle gegen BEV gp70 reagierenden Seren auch in diesem Test positiv waren, während negative Seren ebenfalls nicht reagierten.

Die Spezifität der gegen BEV gp70/M7-CF0002 reagierenden Antikörper wurde durch Kompetitionsversuche einzugrenzen versucht. Als Kompetitoren wurden dazu verwendet: Foetales

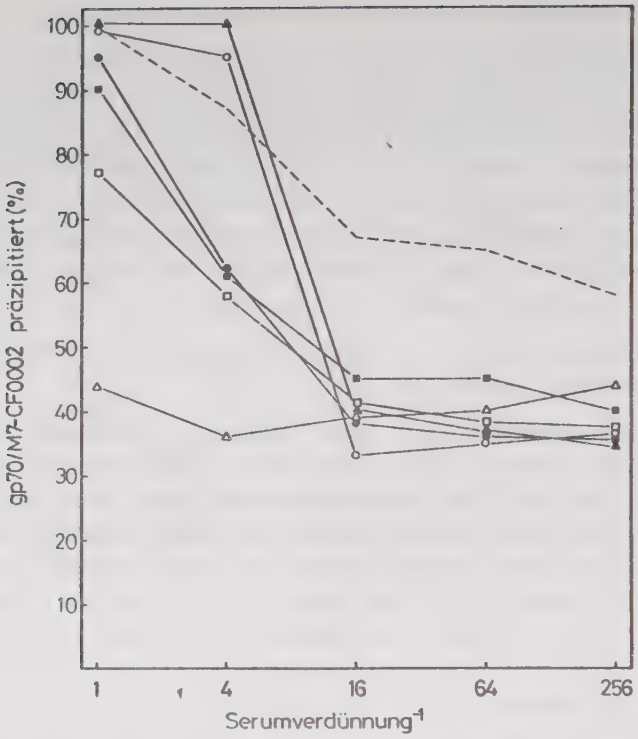


Abb. 7: Titration einiger Seren von Patienten mit Terato- und Embryonalen Carcinomen gegen gp70/M7-CF0002.

○ TS 1 ■ ECS 1 --- anti-BEV-NC37
● TS 4 △ NHS 1
□ TS 3 ▲ NHS 2

TS = Teratocarcinomseren
ECS = Seren von Patienten mit Embryonalen Carc.
NHS = normales Humanserum

Kälberserum (FKS), Rinderserumalbumin, α-Methyl-D-mannosit, Transferrin als käufliches Glycoprotein, N-Acetylneuraminsäure aus menschlichem Urin und N-Acetylneuraminsäure, die synthetisch hergestellt war, Glucose, Maltose und Lactose. Foetales Kälberserum ist in der Lage, die positive Anti-

körperreaktion menschlicher Seren zu hemmen. Die Kompetition nimmt mit steigender Verdünnung ab und ist bei einem Faktor von 1:256 kaum noch erkennbar. Abbildung 8 veranschaulicht diese Ergebnisse.

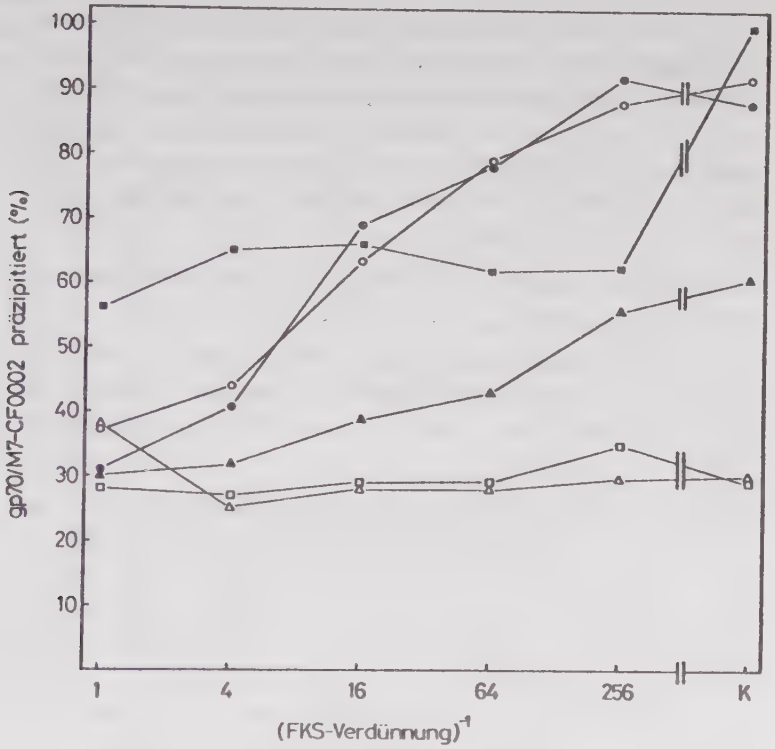


Abb. 8: Kompetition der Immunreaktion von Humanseren gegen BEV gp70 durch FKS.

■ anti-BEV-NC37
□ NGS
△ NHS 1
● NHS 2
○ TS 1
▲ TS 4

K = Kontrolle ohne FKS

Gereinigtes Rinderserumalbumin (BSA) zeigt eine leichte Hemmung humaner Seren um 15 - 20 % bei einem Einsatz von 10^3 ng BSA/10 µl Testserum. Die Kompetitionsreaktion nimmt mit steigender Verdünnung ab, hyperimmunes Ziegenserum wird nicht inhibiert.

Der Versuch, die kompetitierenden Agentien im FKS durch einen Trennungsschritt über eine Linsen-Lectin-Säule zu gewinnen, verlief negativ. Der Säulendurchlauf und die durch Elution mit 1 M α-Methyl-D-mannosit gewonnenen Kohlehydrate inhibieren alle eingesetzten Humanseren gleich stark. Die Reaktion des Anti-BEV-NC37-Serums der Ziege wird nicht kompetitiert.

Mit α-Methyl-D-mannosit konnte keine Reaktionsminderung festgestellt werden.

Als nicht-virales Glycoprotein wurde im Handel erhältliches humanes Transferrin gegen die positiv reagierenden Teratocarcinom- und EC-Seren eingesetzt. Eine Kompetition war nicht feststellbar.

Über die genaue Kohlehydrat-Ketten-Konformation der Glycoproteine von Primaten-C-Typ Viren ist noch nichts genaues bekannt. Von den murinen C-Typ-Viren weiß man jedoch, daß ihre Glycoproteine als endständige Zucker N-Acetylneuraminsäure besitzen (36). Um zu untersuchen, ob sich die humane Antikörperreaktion gegen BEV gp70/M7-CF0002 durch Zugabe von N-Acetylneuraminsäure kompetitieren läßt, wurden zwei verschieden gewonnene Produkte getestet, synthetisch hergestellte und humane N-Acetylneuraminsäure. In beiden Ansätzen wurde eine Anfangskonzentration von 50 µg Substanz/10 µl Testserum eingesetzt. Weder bei der synthetischen noch bei der humanen Sialinsäure konnte eine Kompetitionsreaktion festgestellt werden. Positive Ergebnisse wurden dagegen mit anderen Oligosacchariden als Kompetitoren erzielt. Sowohl Glucose als auch Maltose und Lactose interferierten mit den humanen Antikörpern und hemmten deren Reaktion.

Es wurden drei verschiedene Verdünnungen (1 M, 0,1 M und 0,01 M) der Zucker/10 µl Testserum eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß verschiedene Seren auf die Zucker unterschiedlich reagierten; während sich einige Seren mit Glucose gut kompetitieren ließen, waren andere durch Lactose besser zu hemmen. Maltose zeigte insgesamt eine weniger ausgeprägte Kompetitionsfähigkeit, jedoch war auch hier eine Titerreduktion zu erkennen. Als Beispiel für diese Testreihe zeigt Abbildung 9 die Kompetitionsreaktion mit Lactose als interferierenden Zucker.

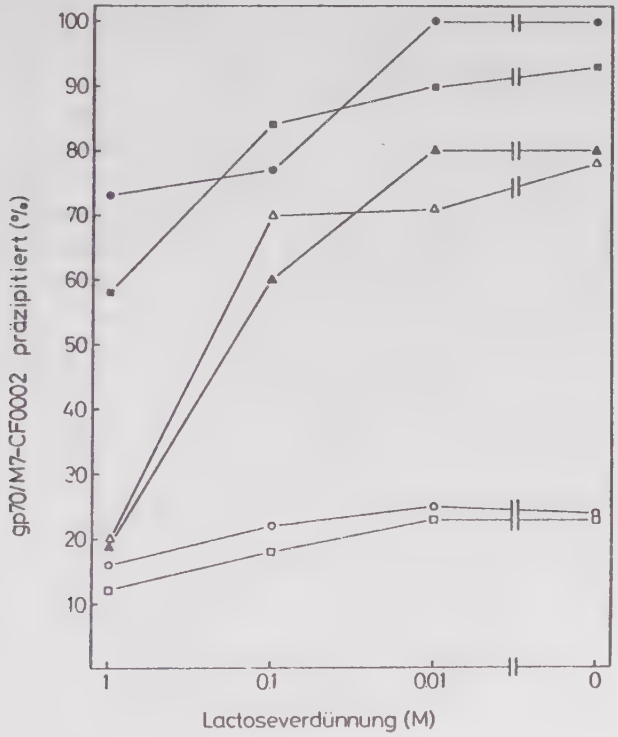


Abb. 9: Kompetition durch Lactose

● anti-BEV-NC37
○ NGS
□ NHS 1
■ NHS 2
▲ TS 2
△ TS 4

Kompetition mit Zellysaten

Es wurden vier verschiedene Zellysate hergestellt:

1 - von uninfizierten Mausfibroblasten
2 - von uninfizierten Hundethymuszellen (8155)
3 - von BEV-M7-infizierten Hundethymuszellen (M7-CF0002)
4 - von BEV-M7-infizierten menschlichen Rhabdomyosarkomzellen (M7-A204)

Alle Lysate wurden mit einer Anfangskonzentration von 10^5 ng Protein/10 µl Testserum eingesetzt und in Zehnerschritten bis 100 ng Protein/10 µl Serum verdünnt. In Abbildung 10 wird das Ergebnis dieser Testreihe dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur ein Serum als Beispiel ausgewählt (Seite 41).

Das Lysat der BEV-infizierten humanen Zelle M7-A204 kompetitiert nicht, die Lysate der animalen Zellen inhibieren sowohl infiziert als auch uninfiziert die Antikörperreaktion. Es ist zu beobachten, daß die murinen Zellen besser kompetitieren als die Hundethymuszellen; erstere zeigen bei 100 ng Protein/10 µl Serum noch eine etwa 40 %ige Reaktionshemmung, während letztere schon bei 1000 ng Protein/10 µl Serum kaum noch kompetitieren. Anhand dieser Abbildung kann man auch erkennen, daß bei Einsatz der gleichen Menge Radioaktivität/Test und Röhrchen die maximale Reaktion eines Serums zwischen 100 % und etwa 120 % Präzipitation schwanken kann (Δ).

Das Typ-spezifische anti-BEV-NC37-Ziegenserum wurde von den Lysaten 1 - 3 nicht gehemmt, wohl dagegen, wenn auch nur in der höchsten Konzentration, von Lysat 4. Abbildung 11 verdeutlicht dieses Ergebnis (Seite 42).

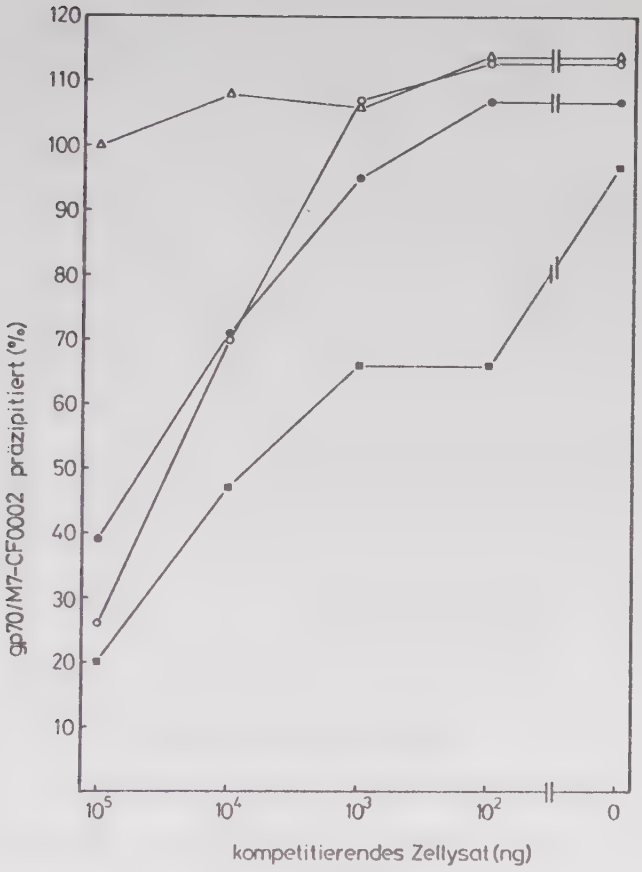


Abb. 10: Kompetition der verschiedenen Zellysate, dargestellt am Beispiel von TS 2

- ● 8155-Lysat
- ○ M7-CF0002-Lysat
- ■ 3T3 (Mausfibroblasten)-Lysat
- △ M7-A204-Lysat

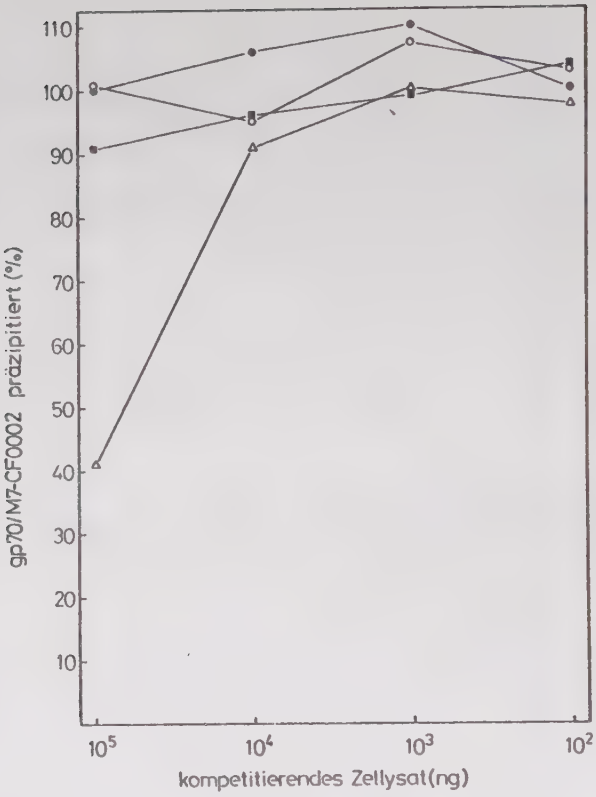


Abb. 11: Kompetition des Typ-spezifischen Ziegenserums durch verschiedene Zellysate.

● 8155-Lysat
■ 3T3-Lysat
○ M7-CF0002-Lysat
△ M7-A204-Lysat

Radioimmunpräzipitation nach Glycosidase-Verdau

Von den Glycoproteinen von BEV/M7-A204 und BEV/M7-CF0002 wurden mit N-Acetylneuraminidase und Endoglycosidase H die Zuckerketten abgedaut und die verbliebenen Proteinkomplexe gegen Humanseren mit hohem anti-gp70-Antikörpertiter eingesetzt.

Vor dem Testansatz wurde die Enzymreaktion im SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Die behandelten Glycoproteine liefen im Gel schneller als die unbehandelten Vergleichsproben und zeigten eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 65000. Das als Kontrolle für Verunreinigungen der Glycosidasen mit Proteasen eingesetzte BSA blieb unverdaut.

Alle anschließend im RIA eingesetzten humanen Seren waren nicht mehr in der Lage, das deglycosylierte Virus-Antigen zu präzipitieren. Einen leichten Titerverlust zeigte auch das anti-BEV-NC37-Antiserum.

5. DISKUSSION

Retroviren sind als Verursacher von Leukämien und Tumoren in Vertebraten schon seit langem bekannt. In Primaten wurden Viren dieses Typs erst in den letzten Jahren gefunden und konnten auch hier mit Leukämien (41,42) und Sarkomen (43) in Verbindung gebracht werden. Seit Entdeckung der Retroviren ist die Frage, ob solche Partikel auch im Menschen vorkommen, von vielen Forschergruppen untersucht worden, aber eine eindeutige Antwort wurde bis jetzt noch nicht gefunden. Jedoch deuten vereinzelte Ergebnisse der letzten Jahre darauf hin, daß zumindest Teile eines viralen oder Virus-ähnlichen Genoms in menschlichen Zellen vorhanden sind und auch, vielleicht nur partiell, exprimiert werden. So wurden C-Typ-Partikel in menschlichen Plazenten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gefunden (37), Reverse Transcriptase konnte in Plazenten nachgewiesen werden (11) und Hybridisierungsexperimente zeigten - wenn auch geringe - Homologien mit viraler Nucleinsäure in menschlicher DNA (6,47). Besonderes Interesse fand die Demonstration einer humoralen Immunantwort im Menschen gegen C-Typ-Viren bzw. virale Strukturproteine (16-19, 21). Diese Antikörperreaktion ist IgG-vermittelt (21) und richtet sich hauptsächlich gegen das auf der Virusoberfläche befindliche Glycoprotein. Die Struktur dieser Kohlehydrat-Protein-Komplexe ist noch nicht genau bekannt, doch wird angenommen, daß die Glycosylierung kein viruscodierter, sondern ein Wirtszell-abhängiger Prozeß ist (58). Das würde bedeuten, daß ein und dasselbe Virus, aus Zellen verschiedener Spezies isoliert, unterschiedlich glycosyliert ist.

Andererseits sind auch Untersuchungen, vor allem an murinen C-Typ-Viren, bekannt, welche vermuten lassen, daß die Glycosylierung nicht nur zellabhängig ist, sondern daß die Aminosäuresequenz des Proteins den Prozeß der Glycosylie-

rung durchaus beeinflussen bzw. kontrollieren kann (28,45). Eine Klärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse wäre nicht nur im Hinblick auf die Untersuchungen der Spezifität der humanen Immunreaktion gegen virale Strukturproteine von großer Wichtigkeit.

In dieser Arbeit wurde die Immunreaktion humaner Seren gegen die BEV-Strukturproteine p30 und gp70 untersucht und die Antikörperspezifität der positiven Seren einzugrenzen versucht.

Es konnte keine besonders auffällige Reaktion gegen BEV p30 festgestellt werden. Ergebnisse anderer Gruppen, die neben einer Reaktion gegen das gesamte Virus auch eine solche gegen p30 publizierten (59), konnten mit dem gereinigten Protein nicht bestätigt werden.

Die Immunpräzipitationen mit gereinigtem gp70 von BEV/M7-CF0002 zeigten dagegen bei einer Reihe von Seren eine sehr hohe Antikörperreaktion gegen das Glycoprotein. Wie aus Tabelle 4 (Seite 33) ersichtlich, ergab sich dabei von 9 untersuchten Kollektiven von Gesunden und Patienten, daß nur bei den Lymphompatienten kein einziges positives Serum nachweisbar war. Die Stärke der Immunreaktionen reicht von schwach positiven Präzipitationen, d.h. solchen, die nur leicht über dem Background-Niveau negativer Kontrollseren lagen, bis zu Seren, die in der Lage waren, 100 % des ^{125}J-markierten Antigens zu präzipitieren (siehe Abb. 6). Besonders auffällig waren dabei Patienten mit Hodentumoren. 70 % dieser Seren zeigte einen erhöhten Antikörpertiter. Diese Ergebnisse sind insofern sehr interessant, weil in unserem Labor in Teratocarcinomzellen von 5 Patienten eine Virusproduktion beobachtet wurde (46).

In den danach notwendig werdenden Versuchen ging es um die Frage, ob die anti-viralen Antikörper gegen den viruscodierten Proteinanteil oder gegen den zumindest teilweise zellbestimmten Kohlehydratanteil gerichtet sind. Es sind verschiedene Wege beschritten worden, einer diesbezüglichen Antwort näherzukommen. Zum einen wurde BEV in Zellen

verschiedener Spezies gezüchtet, nämlich einer Hundezelle und einer menschlichen Zelle. Wenn die Antikörper gegen den Kohlehydrat-Komplex gerichtet sind und die Glycosylierung des Hüllproteins ein zellabhängiger Prozeß ist, sollten die humanen Seren nicht gegen das gp70 von Viren aus M7-A204 Humanzellen reagieren, weil ein Organismus in der Regel tolerant ist gegenüber körpereigenen Zuckern. Tatsächlich fielen die Tests, in denen Humanseren gegen gp70 von den M7-A204-Zellen eingesetzt wurden, alle negativ aus. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß die Immunreaktion nicht gegen das Protein, also nicht primär virus-spezifisch gerichtet ist.

Zum anderen wurde versucht, die positive Antikörperreaktion gegen gp70 aus M7-CF0002 zu kompetitieren. Es ist bekannt, daß die Kohlehydrat-Anteile des Mäuse-Leukämie-Virus (MuLV) als terminale Zucker N-Acetylneuraminsäure enthalten und unter anderem Mannose-reiche Seitenketten besitzen (45). Aus diesem Grund, und weil α-Methyl-D-mannosit in der Lage ist, bei dem Reinigungsschritt über die Linsen-Lectin-Säule das Glycoprotein zu eluieren, wurde neben Transferrin als käuflichem Glycoprotein und synthetischer sowie menschlicher N-Acetylneuraminsäure auch α-Methyl-D-mannosit zur Kompetition im Test eingesetzt. Alle Agentien hatten keinen Einfluß auf die Reaktion.

Ein Grund hierfür ist sicherlich, daß auch die Konformation der Zuckerketten eine Rolle spielt und die Antikörper nicht gegen einzelne Mono- oder Oligosaccharide gerichtet sind. Andererseits ließ sich die Reaktion der Humanseren durch Lactose, Maltose und Glucose durchaus kompetitieren. Die Tatsache, daß einzelne Seren durch verschiedene Zucker unterschiedlich beeinflußt werden, zeigt, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um eine homogene Antikörperpopulation handelt.

FKS konnte die Antikörper aller humanen Seren und auch des Typ-spezifischen Ziegenserums hemmen. Diese Reaktion scheint aufgrund der vielen verschiedenen Glycoproteine im

FKS unspezifisch zu sein. BSA, als quantitativ wichtiges Protein im FKS, welches oft schwer von den Glycoproteinen abzutrennen war, kompetitierte nur sehr schwach und kann somit an der Reaktion des gesamten FKS nur unwesentlich mitwirken. Der Versuch, die hemmenden Substanzen aus dem FKS mittels einer Linsen-Lectin-Säule zu entfernen, mißlang, d.h. sowohl Durchlauf als auch Eluat der Säule kompetitierten im RIA gleich gut. Da Linsen-Lectin eine spezifische Bindungsaffinität zu α-D-Glucose und α-D-Mannose besitzt, können andere, nicht bindende Oligosaccharide im Durchlauf für diese Reaktion verantwortlich sein. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Immunreaktion humaner Seren gegen gp70/M7-CF0002 durch BSA nicht, durch einzelne Zucker und Zuckergemische jedoch mit unterschiedlicher Stärke inhibiert werden konnte. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf die Zucker-gerichtete Spezifität der humanen Antikörperreaktion.

Kompetitionen mit Zellysaten verschiedener Spezies haben diese Interpretation erhärtet. Vor allem die Interferenz nicht infizierter Maus- und Hundezellen zeigt, daß die mit dem BEV-Glycoprotein reagierenden Antikörper nicht gegen den Protein-Komplex gerichtet zu sein scheinen.

Wie Portetelle et al. (25) zeigen konnten, sind Antikörper, die in Kaninchen durch Immunisierung mit gereinigtem gp51 des Rinderleukämievirus induziert wurden, nur unwesentlich gegen den Kohlehydrat-, sondern vor allem gegen den Proteinkomplex des Glycoproteins gerichtet, denn sie lassen sich durch Glycosidase-Verdau des Zuckeranteils nicht in ihrem Titer reduzieren. Das in dieser Arbeit als positives Kontrollserum eingesetzte anti-BEV-NC37-Serum ist durch Immunisierung einer Ziege mit Detergens-behandeltem Virus gewonnen worden. Es ließ sich daher durch einige Kompetitionen (z.B. Lactose) schwach hemmen in seiner Präzipitations-Reaktion, zeigte aber andererseits bei uninfizierten Zellen in den Kompetitionsexperimenten mit Zellysat im Gegensatz zu den Humanseren keine Titerreduktion. Kompetitiert wurde es erst mit dem Zellysat von M7-A204, der BEV-

infizierten menschlichen Rhabdomyosarkomlinie. Bei diesem Ansatz wurden dagegen die menschlichen Seren nicht beeinflußt in ihrer Reaktion, was die vorhergehenden Ergebnisse bestätigt und die Diskussion einer nicht Protein-gerichteten Antikörperspezifität unterstützt.

Eine weitere Möglichkeit, die Frage nach der Antikörperspezifität humaner Seren zu beantworten, bestand in dem enzymatischen Abbau der Zuckerkomponente des viralen Glycoproteins und dem anschließenden Versuch, die verbleibende Proteinkomponente mit den Humanseren zu präzipitieren. Nach erfolgreichem Glycosidase-Verdau der Kohlehydrate fand keine Protein-Präzipitation durch die Testseren mehr statt, so daß gesagt werden kann, daß die humanen Antikörper gegen die Zuckerkomponente des Glycoproteins gerichtet sein müssen.

Die positive humorale Immunreaktion vieler Humanseren läßt sich also sehr wahrscheinlich auf heterophile Antikörper zurückführen, welche die sogenannte natürliche Immunität eines jeden Organismus ausmachen, ein breites Reaktionsspektrum haben und eben auch gegen Teile der viralen Glycoproteine gerichtet sind (19,20,27). Sie werden durch eine Vielzahl von Antigenen induziert, wie z.B. durch Bakterien des Intestinaltrakts, durch subklinische Infektion oder durch Nahrungsmittel. Die diskutierten Ergebnisse schließen allerdings nicht aus, daß die Antikörperreaktion vieler Menschen Virus-induziert ist. Eine (vielleicht temporäre) Virusproduktion einiger Zellen im Organismus - z.B. in den Tumorzellen der Teratocarcinome - könnte wie ein Booster-Effekt wirken und die Antikörperproduktion unspezifisch erhöhen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Retroviren (Oncoviren) sind ätiologisch mit einer großen Anzahl von Erkrankungen, vor allem Leukämien und Sarkomen, in vielen Säugetieren einschließlich Primaten assoziiert. Der Nachweis des Virusenzyms Reverse Transcriptase in menschlichem Plazenta-Gewebe (11), von Virus-ähnlichen DNA-Sequenzen im humanen Genom (57) und von Antigenen, welche mit Retrovirus-Strukturproteinen kreuzreagieren, in humanem Gewebe (59), hat zu der Frage geführt, ob Oncoviren auch beim Menschen vorkommen und Erkrankungen hervorrufen können.

Eine Möglichkeit, nach einem humanen Retrovirus zu suchen, besteht in der Untersuchung von menschlichen Seren auf Antikörper gegen Oncoviren bzw. deren Strukturproteine. Da bisher keine Retroviren des Menschen eindeutig nachgewiesen werden konnten, nimmt man stellvertretend Retroviren höherer Primaten als Antigene zur Untersuchung einer möglichen anti-viralen Immunität beim Menschen. Die immunologische Basis für diesen Ansatz ist begründet in der Existenz sogenannter interspezies-spezifischer Determinanten auf einigen Virusstrukturproteinen, über deren Kreuzreaktion man mit Hilfe sehr sensitiver Radioimmunotests Antikörper gegen ein humanes Retrovirus zu finden versucht.

In dieser Arbeit wurde die Reaktivität humaner Seren gegen die gereinigten Strukturproteine p30 und gp70 des endogenen Pavianvirus BEV untersucht. BEV ist als endogenes Primaten-Retrovirus, dessen Genom auch bruchstückhaft in menschlicher DNA nachweisbar ist, besonders interessant. Es wurden Seren von Gesunden sowie von Patienten mit Leukämien, Lymphomen, Karzinomen und anderen Erkrankungen untersucht. Es stellte sich heraus, daß eine Immunantwort gegen das Hüllprotein gp70 existiert, nicht jedoch gegen das Kernschalenprotein p30.

Ungeachtet der wichtigen Rolle des Hüll-Glycoproteins der Oncoviren in Bezug auf Infektiosität und Antigenität

ist bis jetzt wenig bekannt über seine Struktur. Zwar wird allgemein angenommen, daß die Glycosylierung des Proteins ein Wirtszell-abhängiger Prozeß ist, doch sind auch Arbeiten bekannt, die zeigen, daß das Retrovirus-Genom offenbar einen Einfluß auf den Glycosylierungsprozeß ausübt. Da die Frage besteht, ob die gegen Glycoproteine anderer C-Typ-Viren (SSV/SSAV,FLV) (16-19)gerichteten humanen Antikörper gegen den Kohlehydrat- oder gegen den Proteinanteil des Glycoprotein-Komplexes gerichtet sind, wurde BEV bewußt in zwei Zellen verschiedener Spezies gezüchtet, einer Hundethymuszelle (CF0002) und einer humanen Rhabdomyosarkomzelle (A204). Bei einer Wirtszell-abhängigen Glycosylierung sollte der Kohlehydratanteil der beiden Glycoproteine verschieden sein und die humane Immunreaktion unterschiedlich ausfallen. Eine positive Reaktion mit menschlichen Seren konnte in der Tat nur mit dem Glycoprotein von BEV aus der Hundethymuszelle beobachtet werden.

Es wurde versucht, die Reaktion humaner Seren gegen das Virusglycoprotein mit verschiedenen Agentien zu kompetitieren oder durch enzymatischen Verdau der Zuckerdeterminante des Glycoproteins zu eliminieren. Eine Kompetition der humanen Immunantwort war, mit unterschiedlicher Stärke, möglich durch verschiedene Oligosaccharide wie z.B. Lactose und Glucose, sowie mit Lysaten von infizierten und uninfizierten Zellen verschiedener Spezies, z.B. Mäusefibroblasten und Hundethymuszellen. BSA als Protein konnte die Reaktion nicht hemmen. Nach enzymatischem Verdau der Zuckerkomponente durch N-Acetylneuraminsäure und Endoglycosidase H war eine Präzipitation des gp70 durch humane Seren nicht mehr möglich.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die positive humorale Immunantwort vieler Humanseren gegen den Kohlehydrat- und nicht gegen den Protein-Anteil des Glycoprotein-Komplexes gerichtet ist und sich also auf heterophile Antikörper zurückführen läßt, welche die natürliche Immunität eines Organismus ausmachen und ein breites Reaktionsspektrum haben.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Ellermann, V. und Bang, O. (1908):
Experimentelle Leukämie bei Hühnern.
Zentralbl. Bakteriol. (Orig.A) 46, 595-609.

2. Deinhardt, F., Wolfe,L., Northrop,R., Marczynska,B., Ogden,J., McDonald,R., Falk,L., Shramek,G., Smith,R. and Deinhardt,J. (1972):
Induction of neoplasms by viruses in marmoset monkeys.
J. Med. Primatol. 1, 29-50

3. Kawakami,T.G., Buckley,P.M., McDowell,T.S. and DePaoli, T.S. (1973):
A comparative study in vitro of a simian virus isolated from spontaneous woolly monkey fibrosarcoma and of a known feline fibrosarcoma virus.
Bibl. Haematol. 39, 236-243.

4. Kalter, S.S., Helmike,R.J., Panigel, M. (1973):
Observations of apparent C-type particles in baboon (Papio cynocephalus) placentas.
Science 179, 1332-1333.

5. Todaro,G.J., Sherr,C.J., Sen,A,, King,N., Daniel,M.D. and Fleckenstein,B. (1978):
Endogenous New World primate type C viruses isolated from owl monkey (Aotus trivirgatus) kidney cell line.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1004-1008.

6. Wong-Staal,F., Gillespie,D.H. and Gallo,R.C. (1976):
Proviral Sequences of baboon endogenous type C RNA virus in DNA of human leukaemic tissues.
Nature 262, 190-195.

7. Benveniste,R.E. and Todaro, G.J. (1976):
Evolution of type C viral genes: Evidence for an Asian origin of man.
Nature 261, 101-108.

8. Benveniste, R.E. and Todaro, G.J. (1974):
Evolution of type C viral genes: I. Nucleic acid from baboon type C virus as a measure of divergence among primate species.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4513-4518.

9. Fine, D.L., Arthur, L.O. and Schochetman, G. (1980):
Functionally conserved determinants on gp70s of endogenous primate retroviruses.
Virology 101, 176-184.

10. Bonner, T. and Todaro, G. (1980):
The Evolution of Baboon Endogenous Type C Virus: Related Sequences in the DNA of Distant Species.
Virology 103, 217-227.

11. Nelson, J., Leong, J.A. and Levy, J.A. (1978):
Normal human placentas contain RNA-directed DNA polymerase activity like that in viruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, No. 12, 6263-6267.

12. Hanna, M.G. Jr., Tennant, R.W., Yuhas, J.M. (1972):
Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus antigens in mice with a low natural incidence of lymphoma.
Cancer Res. 32, 2226-2234.

13. Ihle, J.N., Yurconic, M. Jr., Hanna, M.G. Jr. (1973):
Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus. Radioimmune precipitation assay of mouse serum antibody levels.
J. Exp. Med. 138, 194-208.

14. Riggs, J.L., Oshiro, L.S., Taylor, D.V. (1973):
Prevalence of type C virus and antibodies in normal cats and cats with neoplasia.
J. Natl. Cancer Inst. 51, 449-454.

15. Weislow, O.S., Schneider, S., Heberling, R.L., Kalter, S.S. and Hellman, A. (1976):
Autogenous Humoral Immunity to Baboon Xenotropic Endogenous Type C Virus.
J. Natl. Cancer Inst. 57, No. 3, 561-565.

16. Kurth, R., Teich, N.M., Weiss, R.A. and Oliver, R.T.D. (1977)
Natural human antibodies reactive with primate type C viral antigens.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1237-1241.

17. Kurth, R. and Mikschy, U. (1978):
Human antibodies reactive with purified envelope antigens of primate type C tumor viruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5692-5696.

18. Hirsch, M.S., Kelley, A.P., Chapin, D.S., Fuller, T.C., Black, P.H. and Kurth, R. (1978):
Immunity to antigens associated with primate C-tpye oncornaviruses in pregnant women.
Science 199, 1337-1340.

19. Snyder, H.W. Jr., Pincus, T. and Fleissner, E. (1976):
Specificities of human immunoglobulins reactive with antigens in preparations of several mammalian type-C viruses.
Virology 75, 60-73.

20. Stephenson, J.R. and Aaronson, S.A. (1976):
Search for antigens and antibodies crossreactive with type C viruses of woolly monkey and gibbon ape in animal models and in humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1725-1729.

21. Kurth, R. and Schmitt, C. (1977):
Human Humoral Antibodies Specific for Primate C-Type Viral Antigens.
Med. Microbiol. Immunol. 164, 167-177.

22. Ihle, J.N. and Hanna, M.G. (1977):
Natural immunity to endogenous oncornaviruses in mice.
Contemp. Topics Immunobiol. 6, 169-194.

23. Essex, M. (1975):
Horizontally and vertically transmitted oncornaviruses of cats.
Cancer Res. 21, 175-248.

24. Barbacid, M., Bolognesi, D. and Aaronson, S.A. (1980):
Humans have antibodies capable of recognizing oncoviral glycoproteins: Demonstration that these antibodies are formed in response to cellular modification of glycoproteins rather than as consequence of exposure to virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1617-1621.

25. Portetelle, D., Bruck, C., Mammerickx, M. and Burny, A. (1980)
In animals infected by bovine leukemia virus (BLV) antibodies to envelope glycoprotein gp51 are directed against the carbohydrate moiety.
Virology 105, 223-233.

26. Snyder, H.W. Jr. and Fleissner, E. (1980):
Specificity of human antibodies to oncovirus glycoproteins: Recognition of antigen by natural antibodies directed against carbohydrate structures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1622-1626.

27. Löwer, J., Davidson, E.A., Teich, N.M., Weiss, R., Joseph, A.P. Kurth, R. (1980):
Heterophil human antibodies recognize oncovirus envelope antigens: Epidemiological parameters and immunological specificity of the reaction.
Virology, in press.

28. Rich-Rosner, M., Grinna, L.S. and Robbins, P.W. (1980):
Differences in glycosylation patterns of closely related murine leukemia viruses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 67-71.

29. Frank, H., Schwarz, H., Graf, T., Schäfer, W. (1978):
Properties of Mouse Leukemia Virus XV.
Electron Microscopic Studies in the Organisation of Friend Leukemia Virus and Other Mammalian C-Type Viruses.
Z. Naturforsch. 33c, 124-138.

30. Montelaro, R.C. and Bolognesi, D.P. (1978):
Structure and Morphogenesis of Type-C retroviruses.
Advances in Cancer Research 28, 63-89.

31. Dalton, A.J., Melnick, J.L., Bauer, H., Beaudreau, G., Bentveltzen, P., Bolognesi, D., Gallo, R., Graffi, A., Haguenau, F., Heston, W., Huebner, R., Todaro, G. and Heine, U.I. (1974):
The case for a family of reverse transcriptase viruses: Retraviridae.
Intervirology 4, 201-206.

32. Bolognesi, D.P., Langlois, A.J. and Schäfer, W. (1975):
Polypeptides of Mammalian Oncornaviruses. IV. Structural Components of Murine Leukemia Virus Released as Soluble Antigens in Cell Culture.
Virology 68, 550-555.

33. Thiel, H.J., Bergholz, C., Beug, H., Deinhardt, F., Schwarz, H. and Schäfer, W. (1977):
Isolation of the Major Glycoprotein (gp70) of Simian Sarcoma Virus (SSV-2/SSAV-1) in Preparative Quantities.
Z. Naturforsch. 32c, 884-886.

34. Bryant, M.L., Sherr, C.J., Sen, A., Todaro, G.J. (1978):
Molecular Diversity Among Five Different Endogenous Primate Retroviruses.
J. of Virol. 28, No. 1, 300-313.

35. Devare, S.G., Hanson, R.E. and Stephenson, J.R. (1978):
Primate Retroviruses: Envelope Glycoproteins of Endogenous Type C and Type D Viruses Possess Common Interspecies Antigenic Determinants.
J. of Virol. 26, No. 2, 316-324.

36. Altstein, A. and Zhdanov, V.M. (1979):
Envelope Antigens of Oncoviruses.
Advances in Virus Research 25, 451-482.

37. Kalter, S.S., Helmke, R.J., Heberling, R.L., Panigel, M., Fowler, A.K., Strickland, J.E. and Hellman, A. (1973):
C-type particles in normal human placentas.
J. Natl. Cancer Inst. 50, 1081-1084.

38. Gallo, R.C., Gallagher, R.E., Miller, N.R., Mondal, H., Saxinger, W.C., Mayer, R.J., Smith, R.G. and Gillespie, D.H. (1975):
Relationships between components in primate RNA tumor viruses and in the cytoplasm of human leukemic cells: Implications to leukemogenesis.
In: Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 40, 933-961.

39. Viola, M.V., Frazier, M., Wiernik, P., McCredie, K.V. and Spiegelman, S. (1976):
Reverse transcriptase in leukocytes of leukemic patients in remission.
N. Engl. J. Med. 294, 75-80.

40. Bex, F., Bruch, C., Mammerickx, M., Portetelle, D., Ghysdael, J., Cleuter, Y., Leclercq, M., Dekegel, D. and Burny, A. (1979):
Humoral antibody response to bovine leukemia virus infection in cattle and sheep.
Cancer Res. 39, 1118-1123.

41. Snyder, S.P., Dungworth, D.L., Kawakami, T.G., Callaway, E. and Lau, D.T. (1973):
Lymphosarcoma in two gibbons (Hylobates lar) with associated C type virus.
J. Natl. Cancer Inst. 51, 89-94.

42. Goldberg, R.J., Scolnick, E.M., Parks, W.P., Yakovleva, L.A. and Lapin, B.A. (1974):
Isolation of a primate type C virus from a lymphomatous baboon
Int. J. Cancer 14, 722-730.

43. Theilen, G.H., Gould, D., Fowler, M. and Dungworth, D.L. (1971
C type virus in tumor tissue of a woolly monkey (Lagothrix) with fibrosarcoma.
J. Natl. Cancer Inst. 47, 881-884.

44. Chezzi, C., Dettori, G., Manzari, V., Agliano, A.M. and Sanna, A. (1976):
Simultaneous detection of reverse transcriptase and high molecular weight RNA in tissue of patients with Hodgkin's disease and patients with leukemia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4649-4652.

45. Kemp, M.C., Basak, S. and Campans, R.W. (1979):
Glycopeptides of murine leukemia viruses. I. Comparison of two ecotropic viruses.
J. Virol. 31, 1-7.

46. Löwer, J., Löwer, R., Stegmann, J., Frank, H. and Kurth, R.:
Retrovirus Particle Production in Three out of Four Human Teratocarcinoma Cell Lines.
In: Modern Trends in Human Leukemia IV, R. Neth, R.C. Gallo, T. Graf and K. Mannweiler (eds.), Springer Verlag, Berlin, in press.

47. Lemons, R.S., Nash, W.G., O'Brien, S.J., Benveniste, R.E. and Sherr, C.J. (1978):
A Gene (Bevi) on Human Chromosome 6 is an Integration Site for Baboon Type C DNA Provirus in Human Cells.
Cell 14, 995-1005.

48. Schaffner, W. and Weissmann, C. (1973):
A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution.
Analytical Biochem. 56, 502-514.

49. Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H. and Woodlock, J.J. (1969):
Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels.
Analytical Biochem. 30, 148-152.

50. Nelson-Rees, W.A., Owens, R.B., Arnstein, P. and Kniazeff, A.J. (1976):
Source, Alterations, Characteristics and Use of a New Dog Cell line (Cf2Th).
In Vitro 12, No. 10, 665-669.

51. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. and Parks, W.P. (1973):
In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors.
J. Natl. Cancer Inst. 51, 1417-1423.

52. Benveniste, R.E., Lieber, M.M., Livingston, D.M. Sherr, C.J. and Todaro, G.J. (1974):
Infectious C-type virus isolated from a baboon placenta.
Nature 248, 17-20.

53. Bronson, D.L., Fraley, E.E., Fogh, J., Kalter, S.S. (1979):
Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera-1) cell cultures: an electron microscopic study.
J. Natl. Cancer Inst. 63, 337-339.

54. Bronson, D.L., Ritzi, D.M., Fraley, E.E., Dalton, A.J. (1978):
Morphologic evidence for retrovirus production by epithelial cells derived from a human testicular tumor metastasis.
J. Natl. Cancer Inst. 60, 1305-1308.

55. Bolognesi, D.P., Montelaro, R.C., Frank, H. and Schäfer, W. (1978):
Assembly of Type C Oncornaviruses: A Model.
Science 199, 183-186.

56. Witte, O.N. and Baltimore, D. (1978):
Relationship of retrovirus polyprotein cleavages to virion maturation studied with temperature-sensitive murine leukemia virus mutants.
J. Virol. 26, 750-761.

57. Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1980):
Molecular Biology of Primate Retroviruses.
In: Viral Oncology, ed. George Klein, Raven Press, New York.

58. Robertson, M.A., Etchison, J.R., Robertson, J.S. and Summers, D.F. (1978):
Specific changes in the oligosaccharide moieties of VSV grown in different lectin-resistant CHO cells.
Cell 13, 515-526.

59. Mellors, R.C. and Mellors, J.W. (1976):
Antigen related to mammalian type-C RNA viral p30 proteins is licated in renal glomeruli in human systemic lupus erythematosus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, No. 1, 233-237.

60. Gardner, M.B., Rasheed, S., Shimizu, S., Rongey, R.W., Henderson, B.E., McAllister, R.M., Klement, V., Charman, H.P., Gilden, R.V., Heberling, R.L., Huebner, R.J. (1977):
Search for RNA Tumor Virus in Humans.
In: Cold Spring Harbor Symposium on "Origins of Human Cancer", 1253-1285, H.H. Hiatt, J.D. Watson, and J.A. Winsten (eds.), Cold Spring Harbor.

Lebenslauf

Name:	Dorothee Wernicke
geboren:	29. November 1952 in Braunschweig
Eltern:	Vater: Walter Wernicke, Dipl.-Ing. Mutter: Hilda Wernicke geb. Kleemann, Lehrerin
Grundschule:	1959-1963 Evangelische Volksschule "An der Dislichstraße" in Duisburg-Meiderich
Gymnasium:	April 1963 - Mai 1963 Neusprachliches "Käthe-Kollwitz-Gymnasium" in Duisburg-Ruhrort Mai 1963 - Mai 1971 Neusprachliches "Marianne-Weber-Gymnasium" in Lemgo/Lippe Abitur im Mai 1971
Studium:	ab Wintersemester 1971/72 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mündliche Diplomprüfung im Mai 1976 Mai 1976 - Dezember 1977 Anfertigung der Diplomarbeit "Etablierung einer das endogene Pavian-Oncovirus produzierenden Suspensionszelle" bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen
Promotion:	seit Januar 1978 Arbeit an einer Dissertation mit dem Thema "Isolierung von Strukturproteinen des endogenen Pavianvirus BEV und Untersuchung einer spezifischen Immunantwort in humanen Seren" bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

R.-E.Bader, F.-W.Bentrup, V.Braun, D.Gradmann, T.Graf,
K.G.Grell, J.Guglielmi, S.Kemmler-Sack, R.Kurth, R.J.Lorenz,
G.F.Meyer, E.Müller, H.Probst, E.Sander, V.Schwarz, H.Seiler,
H.U.Seitz, H.Wäßle und H.Zähner.